

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Bestemmelse av hCG fra biologiske prøver ved immunoekstraksjon og LC-MS/MS

Metodeoptimalisering og -validering for bruk i dopinganalyse

Karoline Løvsletten



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Vår 2011

Bestemmelse av hCG fra biologiske prøver ved immunoekstraksjon og LC-MS/MS

Metodeoptimalisering og -validering for bruk i dopinganalyse

Karoline Løvsletten

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo

i perioden februar 2010 til mai 2011.

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Hanne Lund, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Førsteamanuensis Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg vil først og fremst få takke mine flinke og inspirerende veiledere Hanne Lund, Léon Reubsæet og Trine Grønhaug Halvorsen for all hjelp og veiledning dere har gitt meg under arbeidet med masteroppgaven.

Jeg vil også få takke alle ansatte ved avdeling for Legemiddelanalyse for at dere gjør arbeidsmiljøet åpent og inkluderende. Det har aldri vært noe problem å få hjelp med hverken faglige eller praktiske spørsmål.

Takk til Jeanette, Ragnhild og Hamid for sosiale og faglige stunder. Det har vært hyggelig å dele kontor med dere og ikke minst å bli bedre kjent med dere!

Tilslutt vil jeg også få takke Robert for all støtte og inspirasjon du har gitt meg! Takk for din tålmodighet og for all god hjelp med korrekturlesing og formatering med oppgaven.

Oslo, mai 2011

Karoline Løvsletten

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Innholdsfortegnelse	4
Sammendrag.....	6
Forkortelser	7
1. Innledning.....	9
1.1 Problemstilling	10
2. Teori.....	11
2.1 Aminosyrer, peptider og proteiner	11
2.1.1 Proteomikk.....	12
2.1.2 Bestemmelse av proteiners primærstruktur.....	13
2.2 hCG.....	14
2.2.1 Struktur og isoformer	14
2.2.2 Biologisk forekomst og metabolisme av hCG og isoformer av hCG.....	16
2.2.3 Biologisk funksjon av hCG	17
2.2.4 hCG-preparater	17
2.2.5 hCG-signaturpeptider	17
2.2.6 Signaturpeptid β T5.....	18
2.2.7 Bruk av intern standard.....	19
2.3 Prøveopparbeidelse fra biologiske prøvematrikser	19
2.3.1 Biologiske matrikser: serum og urin	20
2.3.2 “Bottom-up” strategi.....	20
2.3.3 Trypsinering.....	21
2.3.4 Immunoekstraksjon	22
2.3.5 Fast-fase-ekstraksjon (SPE)	23
2.4 Separasjon ved hjelp av væskeskromatografi.....	23
2.5 Deteksjon	24
2.5.1 Massespektrometri.....	24
2.5.2 Prøveinnføring og ionekilde (Elektrospray)	24
2.5.3 Masseanalysator og detektor	25
3. Materialer.....	28
3.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr.....	28
3.2 Tillaging av løsninger og utstyr	31
3.2.1 Løsninger.....	31
3.2.2 Løsninger til prøveopparbeidelse	31
3.2.3 Løsninger til immunoekstraksjon	32
3.2.4 Løsninger til SPE	33
3.2.5 Mobilfaser	33
3.3 Tillaging av utstyr.....	33
4. Metoder	34
4.1 Prøveopparbeidelse for hCG-prøver i serum og urin.....	34
4.1.1 Immunoekstraksjon	34
4.1.2 Trypsinering.....	37
4.1.3 SPE	37
4.2 Intern standard	38

4.3	Analyse av hCG	39
4.3.1	HPLC-parametre	40
4.3.2	Massespektrometriske parametre ved LC-MS/MS	41
4.4	Validering	43
4.4.1	Nøyaktighet	43
4.4.2	Presisjon: Intradag og interdag	43
4.4.3	Kalibreringskurve, linearitet, LLOQ og LOD	44
4.4.4	Utbytte	44
4.4.5	Stabilitet	45
4.4.6	Matrikseffekter	46
4.4.7	Selektivitet	46
5.	Resultat og diskusjon	47
5.1	Innledning til resultater	47
5.1.1	Variasjon ved tilsetning av intern standard	48
5.1.2	Monitorering av fragmentioner for β T5 og is β T5	49
5.1.3	Oppsummering fra innledende resultater	50
5.2	Valg av immunoekstraksjonsmetode	50
5.2.1	Kalibreringskurver ved bruk av brønner og magnetiske kuler	51
5.2.2	LOD for hCG ekstrahert fra serum og urin ved bruk av brønner og magnetiske kuler	52
5.2.3	Effekt av temperatur på reduksjon av hCG med magnetiske kuler	55
5.2.4	Optimalisering av prøvevolum ved bruk av magnetiske kuler	56
5.2.5	Metningseksperiment med magnetiske kuler	60
5.2.6	Oppsummering	61
5.3	Validering	61
5.3.1	Nøyaktighet	61
5.3.2	Presisjon intra- og interdag	62
5.3.3	Kalibreringskurve, linearitet, LOD og LLOQ	62
5.3.4	Utbytte	63
5.3.5	Stabilitet	64
5.3.6	Matrikseffekter	67
5.3.7	Selektivitet	68
5.4	Analyse av gravidserum og -urin	69
6.	Konklusjon	71
	Kildeliste	72
	Appendiks 1	76

Sammendrag

Deteksjon av hCG fra biologiske prøver er aktuelt i flere kliniske sammenhenger, som for eksempel i forbindelse med graviditet eller kreftdiagnostisering. I denne oppgaven er det fokusert på deteksjon av hCG i forbindelse med doping og dopinganalyse. hCG er ikke et dopingmiddel i seg selv, men kan benyttes av menn for å opprettholde testosteronproduksjonen etter lengre tids misbruk av anabole steroider.

Hensikten med denne oppgaven var å optimalisere og videreutvikle en metode for bestemmelse av hCG fra serum og urin i kombinasjon med LC-MS/MS deteksjon. Det var ønskelig å sammenligne immunoekstraksjon fra antistoffbelagte brønner og magnetiske kuler, spesifikt rettet mot hCG, dette for å etablere den mest effektive opprensningen og oppkonsentreringen av hCG før LC-MS/MS analyse. Videre var det interessant å sammenligne serum og urin som prøvematrikser med hensyn på prøveopparbeidelsesstrategi. Prøvene ble analysert ved hjelp av LC separasjon etterfulgt av MS deteksjon i SRM modus. Analyseresultatene demonstrerte at urin var best egnet som prøvematriks, og at magnetiske kuler ga bedre sensitivitet enn brønner samt mulighet for å ekstrahere større prøvevolum. Deteksjonsgrensen (LOD) ble målt til 2 IE/L for hCG ekstrahert fra urin ved hjelp av magnetiske kuler. Validering av metoden ga følgende resultater: linearitet $r^2 > 0,999$, nøyaktighet innenfor 15 %, intradag presisjon innenfor 15 % (9-12 % RSD), og interdag presisjon over 15 % for den midterste konsentrasjonen, mens det var under 15 % for den høyeste og laveste konsentrasjonen. Utbytte var 57-65 %. Eksperimentell LOD estimert fra kalibreringskurven ga en verdi på 1,35 IE/L og en LLOQ på 4,52 IE/L. Disse resultatene demonstrerer at metoden kan være godt egnet til rutinemessig bruk i dopinganalyse.

Forkortelser

ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitril
α T2	Tryptisk peptid fra α -subenheten av hCG
β T5	Tryptisk peptid fra β -subenheten av hCG
DA	Dalton, enhet for molekylvekt
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DTT	Ditiotretiol
ESI	Elektrosprayionisering
FSH	Follikkelstimulerende hormon
hCG	Humant koriongonadotropin
hCG α	α -subenhet av hCG
hCG β	β -subenhet av hCG
hCG β cf	Beta-core fragment fra β -subenheten til hCG. Siste degraderingsprodukt av hCG, forekommer i urin
hCG β n	Nicked isoform av hCG β
HCOOH	Maursyre
HPLC	High-performance liquid chromatography - væskekromatografi
IAA	Iodoacetic acid
IE	Internasjonale enheter (mål for biologisk respons)
IS	Intern standard
is β T5	Intern standard for β T5
LC	Væskekromatografi, forkortelse for HPLC
LH	Luteiniserende hormon
LLOQ	Lower limit of quantification - minste kvantifiserbare mengde
LOD	Limit of detection - deteksjonsgrense

MFA	Mobilfase A
MFB	Mobilfase B
mM	Millimol
MS	Massespektrometri
MS/MS	Tandem massespektrometri, to masseanalysatorer etter hverandre
m/z	Masse-ladningsforhold
nmol	Nanomol
PBS	Phosphate buffered saline - Fosfatbuffer
pmol	Pikomol
QqQ	Trippel kvadrupol
REK	Regional etisk komite
rhCG	Rekombinant hCG
RNA	Ribonukleinsyre
RSD	Relativt standard avvik
RPM	Rounds per minute - spinn per minutt
SRM	Selected reaction monitoring - selektiv reaksjon monitorering
SPE	Solid phase extraction - Fast-fase ekstraksjon
TFA	Trifluoroacetic acid - Trifluoreddiksyre
TSH	Tyreoideastimulerende hormon
WADA	World Anti- Doping Agency

1. Innledning

hCG er et glykoprotein-hormon som forekommer naturlig hos gravide kvinner, og har som oppgave å opprettholde progesteronproduksjonen under graviditet. hCG er et molekyl som består av to subenheter (α - og β -subenheterne) som kan forekomme i en rekke hyper- og hypoglykosylerte isoformer, i tillegg til ulike degraderingsvarianter [1]. Det har i de siste årene blitt større interesse rundt hCG og hvilke andre biologiske funksjoner dette molekylet kan ha. Deteksjon av hCG i biologiske prøver har fått en helt ny betydning ved at det kan benyttes til screening for å oppdage Downs syndrom hos fostre, diagnostisere komplikasjoner og feil under svangerskapet, samt være en biomarkør for ulike kreftformer. Viktigheten av å skille mellom de ulike isoformene blir desto større nettopp fordi det ligger så mye klinisk informasjon i hvilke former som blir produsert i kroppen [2]. hCG er også aktuelt innen doping fordi hCG kan benyttes til stimulering av egenproduksjon av testosteron etter nedsatt egenproduksjon på grunn av misbruk av anabole steroider [3]. Immunoassay benyttes i dag for deteksjon av hCG både i dopingsammenheng og i klinisk diagnostikk. Dette er sensitive metoder som bygger på "sandwich" prinsippet. De er likevel forbundet med forekomster av falske negative eller falske positive resultater. hCG er et komplekst molekyl som kan forekomme i ulike isoformer, noe som gjør deteksjon av total uddifferensiert hCG basert på immunoassays for uspesifikt i de tilfeller der det er klinisk viktig å kunne skille mellom nettopp de ulike hCG variantene og forekomsten av dem [3]. I dopinganalyse er det ønskelig å benytte massespektrometrisk deteksjon der det er mulig. MS-deteksjon i kombinasjon med immunoekstraksjon vil kunne gi et spesifikt og sikkert resultat, uten fare for falske negative eller positive analysesvar [4]. WADA (World Anti-Doping Agency) krever at en metode som skal kunne benyttes innen doping må detektere hCG-konsentrasjoner ned til 5 IU/L [5]. Immunoekstraksjon i kombinasjon med LC-MS/MS har blitt det nye verktøyet som gjør det mulig å detektere og differensiere mellom hvilke isoformer som er tilstede i en prøve. Basert på tidligere arbeid utført av Hanne Lund *et al* har det vært ønskelig å optimalisere denne metoden, primært ut fra ønske om lavere LOD og LOQ, og tilpasse den til bruk i dopingsammenheng [6]. Hennes publiserte metode baserte seg i utgangspunktet på immunoekstraksjon av hCG ved bruk av antistoffbelagte brønner spesifikt mot hCG og deteksjon ved bruk av LC-MS (singel kvadrupol) [6]. Metoden har videre blitt utviklet til spesifikk SRM deteksjon utført av en trippel kvadrupol detektor (upublisert arbeide), og det

forventes å nå lavere deteksjonsgrenser enn tidligere. Utfordringen for denne oppgaven ligger i å finne en prøveopparbeidelsesmetode som gjør det mulig å detektere lave konsentrasjoner av hCG typisk i området rundt 5 IE/L. En LC-MS/MS metode basert på skreddersydd SRM design for hCG foreligger, og fokuset i denne oppgaven var derfor å optimalisere prøveopparbeidelsesstrategien basert på immunoekstraksjon for å redusere det komplekse proteininnholdet i primært urin, men også serum. På denne måten antas det å kunne gi adgang for MS deteksjon av lave hCG konsentrasjoner i begge disse matriksene. Oppgaven inngår i stipendiat Hanne Lunds doktorgradsprosjekt med Oslo Universitetssykehus Radiumhospitalet som samarbeidspartnere. I forbindelse med dette er det søkt om og blitt innvilget både økonomisk støtte fra WADA, samt tillatelse fra REK (Regional Etisk Komite), til å utføre en klinisk studie hvor hCG injiseres i friske frivillige menn. Videre skal den etablerte og validerte metoden brukes som analysemetode for å påvise hCG-funnene som man kan forvente i urin eller serum når hCG er injisert komplementært til steroider i dopingsammenheng.

1.1 Problemstilling

Det overordnede målet for oppgaven var å komme fram til en optimal prøveopparbeidelsesstrategi som kan benyttes i kombinasjon med LC-MS/MS deteksjon av hCG i dopinganalyse.

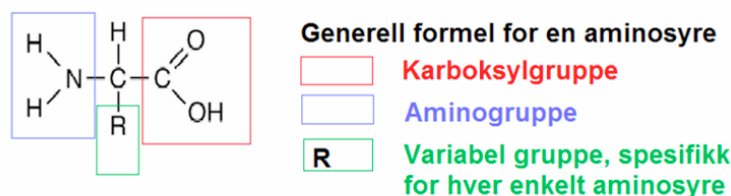
For å oppnå dette hovedmålet ble følgende delmål satt:

- Utføre immunoekstraksjon av hCG, spiket til henholdsvis serum og urin fra legemidlet Pregnyl[®], ved hjelp av først brønner og deretter magnetiske kuler
- Optimalisere immunoekstraksjonsmetoden
- Oppnå deteksjonsgrense (LOD) på minimum 5 IE/L
- Validere metoden etter gjeldene retningslinjer
- Demonstrere valid applikasjon av metoden på endogent produsert hCG ved å analysere serum- og urinprøver fra en gravid kvinne

2. Teori

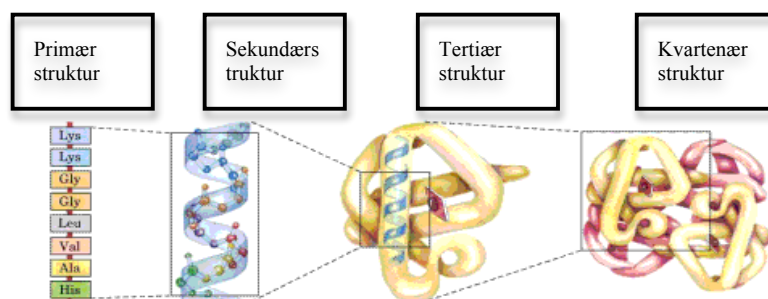
2.1 Aminosyrer, peptider og proteiner

Aminosyrer lages av alle levende organismer og er byggesteiner for proteiner som utøver livsnødvendig prosesser i kroppen som blant annet enzymer og hormoner. Strukturmessig består aminosyrer av et karbonatom som har et hydrogenatom, en aminogruppe, karboksylgruppe og en sidekjede bundet til seg (se figur 2-1). Sidekjeden varierer og det finnes totalt 20 ulike aminosyrer [7].



Figur 2-1: Generell struktur for en aminosyre. Det finnes 20 ulike variable grupper (R) [8].

Et peptid dannes når flere aminosyrer er bundet sammen med peptidbindinger. Aminosyrene avgjør peptiders og proteins struktur (se figur 2-2). Aminosyrekkefølgen utgjør primærstrukturen [9]. Aminosyrenes kjemiske egenskaper gjør at det dannes ulike konformasjoner som kalles sekundærstruktur.



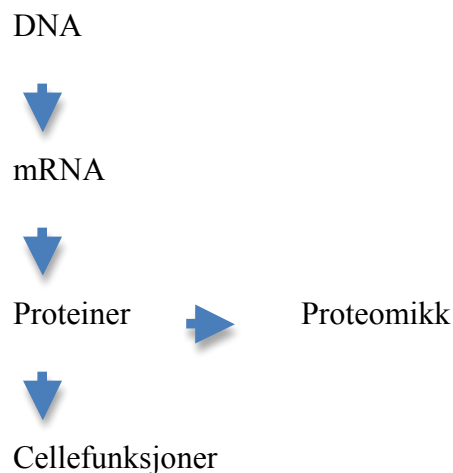
Figur 2-2: Proteinstruktur illustrert av primær, sekundær, tertier og kvarternær proteinstruktur [7].

Peptider inneholder mange aminosyrer som vil danne bindinger til hverandre og danne tertiærstrukturer. Flere subenheter kan sammen danne kvarternære strukturer [7]. For proteiner er ofte strukturen helt avgjørende for utøvelse av biologisk aktivitet [9]. I

beskrivelse av peptider og aminosyrekjeder benyttes ofte begrepene N- terminal ende og C-terminal ende, og dette spiller tilbake på den retningen aminogruppen (N) og karboksygruppen (C) sitter (se figur 2-4 under 2.1.2) [7].

2.1.1 Proteomikk

Proteomikk er studiet av cellens proteinuttrykk. Hvilke proteiner som skal produseres vil til enhver tid være forskjellig og være avhengig av cellens tilstand. Det ligger derfor mye informasjon i hvilke proteiner en celle produserer. Proteomikk er et viktig verktøy som benyttes for å studere cellulære prosesser (se figur 2-3) [10].

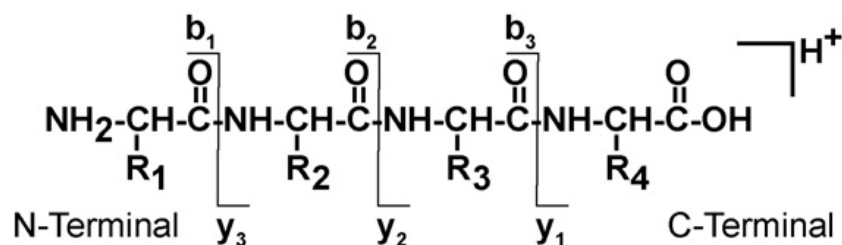


Figur 2-3: Proteomikk er studiet av cellens proteinuttrykk . Oppskriften på hvilke proteiner som skal uttrykkes ligger i DNA og avskrives til mRNA for å danne proteiner.

Menneskets DNA er konstant, mens proteomet, cellens proteinuttrykk vil forandres å være ulikt fra celle til celle [11]. Sammenligning av proteiner fra celler fra friske og syke donorer kan gi nyttig informasjon som kan bidra til sykdomsforklaring og til utarbeidelse av diagnostiske metoder basert på biomarkører [9]. En utfordring ved analyse av cellens proteininnhold er at innholdet er svært høyt. De fleste teknikkene som benyttes innen proteomikk baserer seg derfor først på separasjon og deretter deteksjon. HPLC-separasjon i kombinasjon med MS-deteksjon har vist seg som en egnet metode innen proteomikk fordi det gir bedre deteksjon av proteiner fra komplekse blandinger [10]. MS er et viktig verktøy fordi det har god sensitivitet og robusthet som gjør det i stand til å måle svært nøyaktige masser [11].

2.1.2 Bestemmelse av proteins primærstruktur

Det kan være interessant å sammenligne proteinuttrykk mellom celler fra ulike biologiske tilstander. Ulikt proteinuttrykk kan for eksempel skyldes sykdomstilstander og deteksjon av proteinene kan da bidra til oppdagelse av nye sykdomsmarkører [12]. Proteiners primærstruktur må bestemmes for å få informasjon om hvilke proteiner en celle uttrykker. Massespektrometri (MS) i kombinasjon med databasesøk kan benyttes for å bestemme proteins primærstruktur. For å bestemme proteins primærstruktur ved hjelp av MS klippes proteiner opp til peptider ved hjelp av for eksempel trypsin (se 2.3.3). Deretter separeres de tryptiske peptidene ved kromatografisk separasjon. Peptidene blir detektert i MS og kan fragmenteres ved hjelp av tandem massespektrometer. Flere proteiner kan ha samme masse og ulik primærstruktur fordi de består av de samme aminosyrene. For å finne ut aminosyrerekkefølgen peptidet består av kan peptidet fragmenteres. Spektret av alle fragmentationene som dannes vil være som et fingeravtrykk av peptidet, som igjen kan sammenlignes med kjente spektre lagret i databaser [13]. Det finnes også databaser som kan gjøre et teoretisk klipp av proteinet for å gi informasjon om hvilke peptider som dannes. Peptidsekvensene som består av seks eller flere aminosyrer er ofte unike for moderproteinet. Deteksjon av denne unike aminosyresekvensen gjør det mulig å matche en målt masse med et databasesøk og dermed komme frem til hvilken protein peptidet stammer fra. I denne oppgaven ble det benyttet trippel kvadrupol masseanalysator hvor fragmenteringen skjer i en kollisjonscelle med gassmolekyler. Molekylionene får økt hastighet og kolliderer med hverandre, dette fører til at peptidbindinger brytes og molekylet fragmenteres (se figur 2-4) [11].



Figur 2-4: Fragmenteringsmønster for et peptid. Det dannes b-fragmentioner for fragmenter i N-terminal retning og y-fragmentioner for fragmenter i C-terminal retning [14].

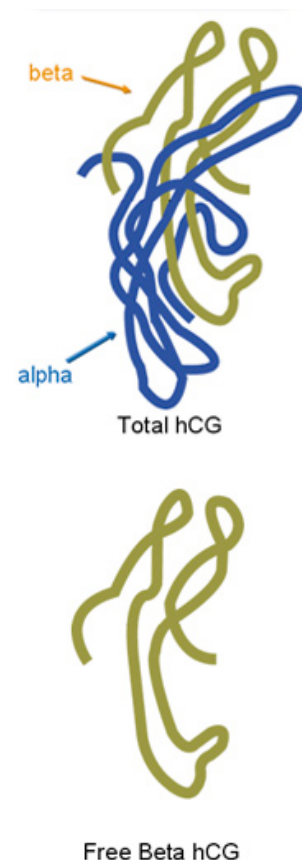
Fragmentering skjer når peptidbindinger i peptidet brytes. Det dannes såkalte γ - og β -fragmenter hvor γ -fragmentationene er de i C-terminal retning, mens β -fragmentationene er de i N-terminal retning [11].

2.2 hCG

Humant koriongonadotropin (hCG) er ofte bedre kjent som ”gravidetsormon”. Hormonet produseres av placenta (morkake) under graviditet, skilles videre ut i urinen til gravide kvinner og er derfor substansen som gir positivt utslag på graviditetstester. Den biologiske aktiviteten til hCG ble kjent i 1919 da det ble injisert ekstrakter av human morkake inn i umodne kaniner og de fikk stimulert eggøsning [15]. Forskning gjort i ettertid viser at hCG stimulerer til økt progesteronproduksjon og derfor brukes hCG i dag blant annet som en del av infertilitetsbehandling hos kvinner [16, 17]. hCG står også oppført på WADAs dopingliste og er forbudt for mannlige idrettsutøvere fordi det ofte benyttes i kombinasjon med anabole steroider [5]. Misbruk av anabole steroider kan gi hypogonadisme, som medfører nedsatt testosteronproduksjon i testiklene og infertilitet. hCG er ikke et prestasjonsfremmende stoff i seg selv, men kan da benyttes for å stimulere til egenproduksjonen av testosteron og reversere hypogonadismen, og slikt sett være en indirekte markør for doping [15].

2.2.1 Struktur og isoformer

hCG er et glykoproteinormon med molekylvekt på ca 37,5 kDa [18]. Hormonfamilien består i tillegg til hCG også av Luteiniserende hormon (LH), Follikkelstimulerende hormon (FSH) og Tyroideastimulerende hormon (TSH). Felles for disse hormonene er at de er heterodimerer, og består en α - og en β -subenhet, hvor α -subenheten er felles for alle fire mens β -subenhetene er ulike og spesifikke for det enkelte hormonet. Inntakt hCG består av α -subenheten som holdes sammen av fem disulfidbindinger og β -subenheten holdes sammen av seks disulfidbindinger [19]. Disse holdes igjen sammen av ikke-

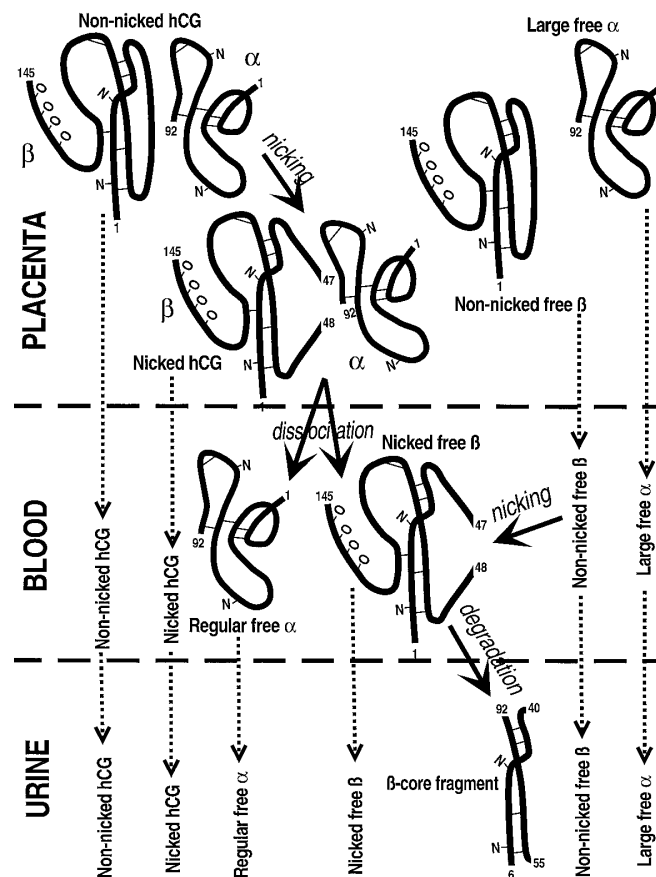


Figur 2-5: hCG består av en α og en β -subenhet. Begge kan forekomme som fri enhet.

kovalente hydrofobe og ioniske interaksjoner [17]. α -subenheten består av 92 aminosyrer og β -subenhet av 145 aminosyrer [15]. hCG kan forekomme i mange varianter og benevnelsen hCG regnes vanligvis som intakt hCG hvor α - og β - subenheten er koblet sammen, subehetene kan også forekomme hver for seg som fri hCG α -subenhet (hCG α) og fri hCG β -subenhet (hCG β) (se figur 2-5). I tillegg kan hCG forekomme i flere varianter, såkalte isoformer [15]. De viktigste isoformene av hCG, i tillegg til intakt hCG er:

- fri hCG β -subenhet (hCG β),
- nicked-hCG (hCGn),
- nicked-hCG β (hCG β n),
- beta-core fragment (hCG β cf).

I tillegg kan disse isoformene forekomme i hypo- og hyper-glykosylerte hCG varianter som har sukkergrupper av ulike størrelser bundet til spesifikke aminosyrer (asparagin eller serin) i proteinkjeden. Hvilke isoformer som er tilstede varierer avhengig av biologisk tilstand [15]. Nicking er en del av degraderingsprosessen av intakt hCG [2]. Nicked hCG dissosieres raskt til frie subenheter og kan videre degraderes til siste degraderingsprodukt, hCG β cf. hCG β cf er degradert fra β -subenheten til hCG og består av to små fragmenter av denne som holdes sammen med disulfidbindinger (se figur 2-6) [2].



Figur 2-6: Bildet viser hCG-strukturer og ulike isoformer som forekommer i placenta, blod og urin. Heltrukne piler viser hvor nicking av intakt hCG foregår. De stiplede pilene indikerer passasje av molekyler fra morkake og ut i blod og urin samt degraderingsprodukter som kan forventes å forekomme [19].

2.2.2 Biologisk forekomst og metabolisme av hCG og isoformer av hCG

Under svangerskapet produseres hCG av trofoblastiske celler i placenta. Nivået av hormonet halveres ved spontan abort og ektopisk svangerskap. hCG-nivået har vist seg å være det dobbelte under graviditet med et foster med Downs syndrom. Under normale forhold som ikke innebærer graviditet, produseres små mengder hCG av hypofysen [2]. Både menn og kvinner kan derfor naturlig skille ut små mengder hCG. Ulike varianter av hCG har blitt detektert i serum- og urinprøver til gravide og kreftpasienter [2]. Utskillelse av hCG β er vanlig i ikke-trofoblastiske krefttyper, og det er en hypotese om at deteksjon av hCG β og hCG β cf i urin kan benyttes diagnostisk i krefttilfeller [20].

Metabolisme av hCG skjer hovedsakelig via leveren. Det er gjort studier hvor det var sett på hvordan hCG fjernes fra sirkulasjonen etter graviditet og etter direkte injeksjon av hCG. Mesteparten av inntatt hCG degraderes til subenheter og nicking varianter i tillegg til hCG β cf (se figur 2-6) [15]. Nickingen er enzymatisk spalting av to aminosyrer i β -subenheten til hCG

og kan forekomme mellom aminosyre 44 og 45, eller 47 og 48 og inngår som et steg i degraderingen av hCG. Nickingen gjør molekylet mer utstabilt og fører til raskere degradering [2]. Nickede varianter av hCG forekommer i serum, urin og placenta, men mest i urin [19]. Sammenlignes metabolismen ved tilført hCG med naturlig produsert hCG, viser det at halveringstiden var kortere for hCG som ble injisert. Årsaken til dette var trolig at mye hCG var blitt degradert allerede under opprensning og fremstilling, og derfor skilles det også raskere ut av kroppen [15]. I urin sammenlignet med serum forekommer hCG oftere i nickede og kløyvde varianter (se figur 2-6) [20]. hCG β cf, den minste og mest degraderte hCG-varianten blir trolig dannet i nyrene da denne isoformen kun detekteres i urin [19].

2.2.3 Biologisk funksjon av hCG

hCG utøver sin effekt via LH/hCG reseptoren. Hovedfunksjonen til hCG er å opprettholde progesteronproduksjonen til det gule legemet den første tiden av svangerskapet. Konsentrasjonen av hCG stiger til sitt maksimale nivå, 10 uker inn i svangerskapet. Hos menn vil LH og hCG stimulere til økt testosteronproduksjon i Leydig-cellene og kan derfor brukes i behandling av hypogonadisme i kombinasjon med FSH [3, 21]. Det er den intakte isoformen av hCG som utøver biologisk funksjon [15]. Det er omdiskutert hvorvidt de frie α - og β -subenhetene av hCG faktisk utøver biologisk aktivitet, men det er imidlertid vist at hCG β *in vitro* stimulerer til vekst av kreftceller ved å forhindre apoptose. Det antas at dette kan være en forklaring på hvorfor hCG β er assosiert med aggressiv kreft [20].

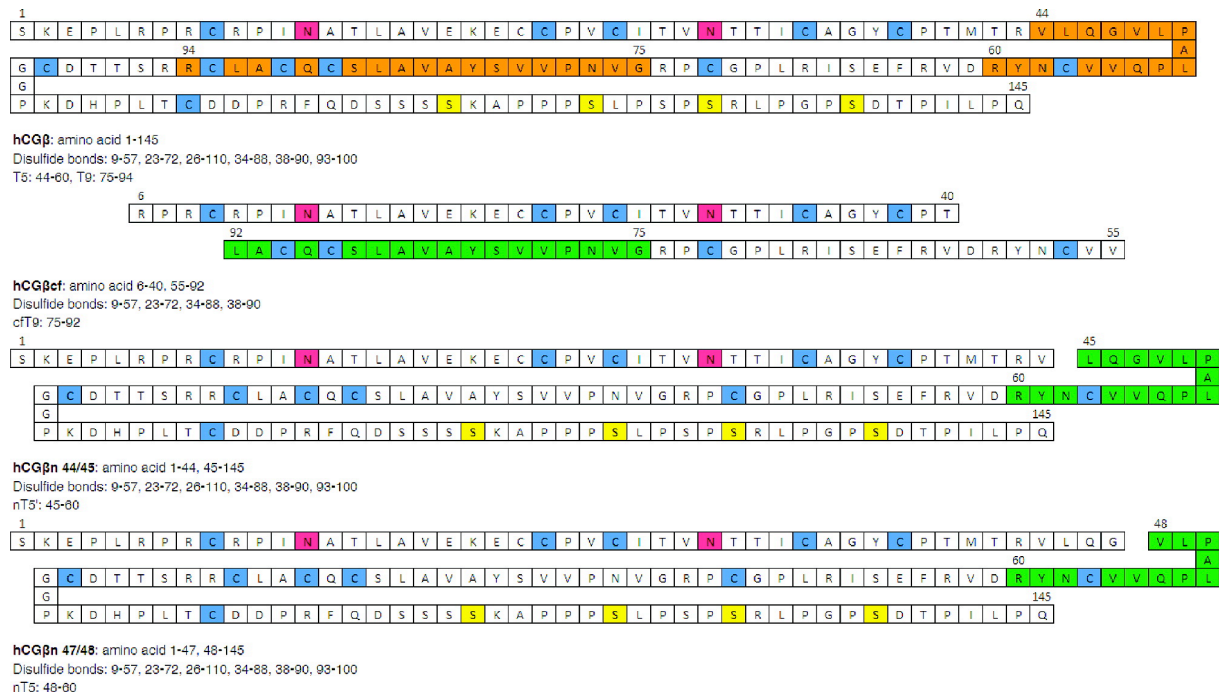
2.2.4 hCG-preparater

I Norge er det 2 reseptbelagte koriongonadotropinpreparater på markedet; Pregnyl[®] og Ovitrelle[®]. Pregnyl[®] inneholder hCG ekstrahert fra gravide kvinners urin. Ovitrelle[®] inneholder rekombinant hCG (rhCG) [22]. Innholdet av hCG i Pregnyl[®] oppgis som internasjonale enheter (IE) som relateres til biologisk aktivitet, mens Ovitrelle[®] oppgis i masseenheter [15]. Ovitrelle[®] inneholder 250 μ g koriongonadotropin som er ekvivalent med ca 6500 IE hCG [22]. I oppgaven er det benyttet Pregnyl[®] som hCG-kilde.

2.2.5 hCG-signaturpeptider

Et signaturpeptid er et peptid som har en unik aminosyresekvens. Signaturpeptider er tryptiske peptider som i deteksjonssammenheng kan fungere som surrogat for moderproteinet.

Det er funnet signaturpeptider for hCG og hCG-isoformer og disse er implementert i deteksjonsmetoden som benyttes i oppgaven (se figur 2-7) [23].



Figur 2-7: Skjematisert presentasjon av aminosyresekvensen til hCGisoformer; hCGβ, hCGβcf, hCGβn 44/45, hCGβn 47/48. De blå aminosyrene er cystein og markerer disulfidbindinger. De rosa og gule aminosyrene markerer hvor suktermolekyler er koblet til proteinkjeden. Signaturpeptid βT5 er det første peptidet som er markert i orange. Det andre orange peptidet representerer signaturpeptid til T9. Signaturpeptid βcfT9, βnT5' og βnT5 er markert i grønt [6].

Figur 2-7 viser hCGβ, den unike og spesifikke delen av hCG, samt modifiserte og degraderte varianter av denne; hCGβcf, to nickede varianter hCGβn 44/45 (βnT5) og hCGβn 47/48 (βnT5'). 44/45 og 47/48 angir hvor aminosyrene er blitt enzymatisk spaltet, nicked. Det har i tillegg til disse signaturpeptidene blitt utarbeidet et signaturpeptid for α-delen av hCG, αT2 som er implementert i LC-MS/MS-metoden, men deteksjon av dette er ikke relevant for denne oppgaven [24].

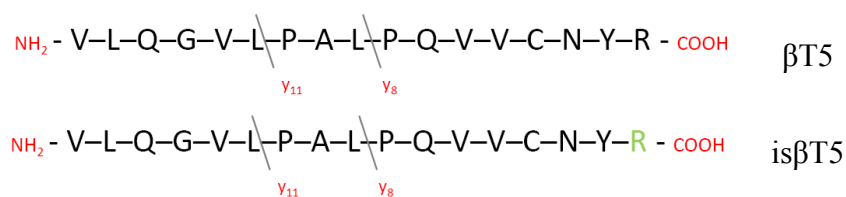
2.2.6 Signaturpeptid βT5

Det har i denne oppgaven blitt valgt å se på signaturpeptid βT5 for sammenligning av eksperimentene og tolkning av resultatene. Dette ble valgt fordi det tryptiske signaturpeptidet βT5 representerer den intakte umodifiserte β-subenheten, som er hyppigst forekommende i både serum og urin, og er et indirekte bevis på at hCG er tilstede. I en artikkel publisert av Gam *et al.* (2003) beskrives en metode for deteksjon av hCG for dopinganalyse ved bruk av immunoekstraksjonskolonner og tandem MS. De valgte å benytte βT5 som markør for hCG.

En årsak til dette var blant annet fordi de så at ved analyse av tryptiske peptider fra hCG var β T5 det peptidet som ga klart høyest signalintensitet, antakelig som følge av både optimal trypsinering og god ionisering i elektropray [25]. Det er en fordel å benytte et peptid som genererer høy signalintensitet fordi det muliggjør å detektere lavere konsentrasjoner. I tillegg er det vist at overflaten av den delen hvor β T5 sitter i hCG molekylet interagerer med hCG-reseptoren i testiklene [25]. Disse begrunnelsene bygger opp under valg av akkurat signaturpeptid β T5.

2.2.7 Bruk av intern standard

Det er viktig at den intern standarden som skal benyttes er så lik originalpeptidet som mulig [26]. Signaturpeptid β T5 regnes som originalpeptid i denne sammenhengen. Det fantes ikke et naturlig forekommende peptid som kunne benyttes som intern standard. Derfor ble det bestilt et syntetisert peptid, spesialprodusert til denne bruken. Dette peptidet har samme aminosyresekvens som β T5, men inneholder imidlertid en isotopanalogue av arginin og er dermed 10 masseenheter tyngre enn β T5 (se figur 2-8). Dette gjør det mulig å skille mellom de to ved bruk av MS selv om de eluerer ut til samme retensjonstid kromatografisk sett. De vil også være tilstrekkelig separert fra de andre peptidene som er tilstede og som monitoreres i metoden. Ved analyse med MS/MS vil β T5 og is β T5 kunne skilles fra hverandre på grunn av masseforskjellen på 10 masseenheter.



Figur 2-8 : Aminosyresekvens til β T5 og is β T5 og fragmentationene y11 og y8, R representerer aminosyren arginin og er markert med grønt for intern standarden.

2.3 Prøveopparbeidelse fra biologiske prøvematrikser

Prøveopparbeidelsen er de trinnene som må gjøres før analytten er klar for analyse. Biologiske matrikser er ofte komplekse og inneholder forurensinger som ikke bør innføres i analyseapparatet, i tillegg til at analytten gjerne forekommer i lave konsentrasjoner. Det er derfor ønskelig å isolere og rense opp analytten fra den matriksen den befinner seg i [26]. I

oppgaven ble det benyttet flere prøveopparbeidelsesteknikker for å isolere og oppkonsentrere hCG fra serum- og urinprøver.

2.3.1 Biologiske matrikser: serum og urin

Serum og urin er to biologiske matrikser som benyttes mye i forbindelse med biologiske analyse. Det er matrikser som forholdsvis enkelt lar seg donere, samt at de kan benyttes til å si noe om biologisk forekomst av stoffer. Urin og serum inneholder begge biomarkører fra kroppen og vil derfor fungere som speiling av hva som har vært i kroppen. Deteksjon av en analytt fra serum eller urin her er derfor et bevis på at analytten har vært i kroppen.

Serum:

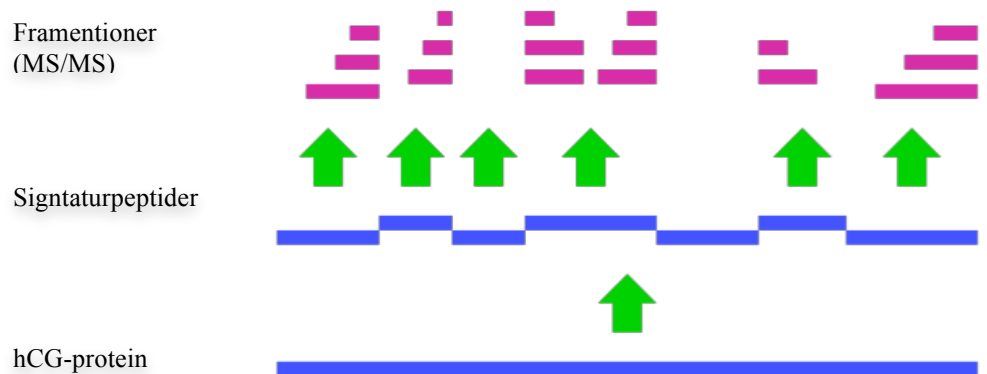
Serum er den klare gulaktige væsken som er igjen fra blod da koagulerte blodcellene er fjernet. Det består hovedsakelig av vann, men også løste proteiner, glukose, ioner, antistoffer, hormoner og avfallsprodukter [27].

Urin:

Urin dannes ved filtrering av blod gjennom nyrene og består av 95 % vann og avfallsprodukter som urea, kreatinin og salter. Urin inneholder vanligvis ikke store mengder proteiner og kan derfor ses på som en enklere matriks enn serum [28].

2.3.2 “Bottom-up” strategi

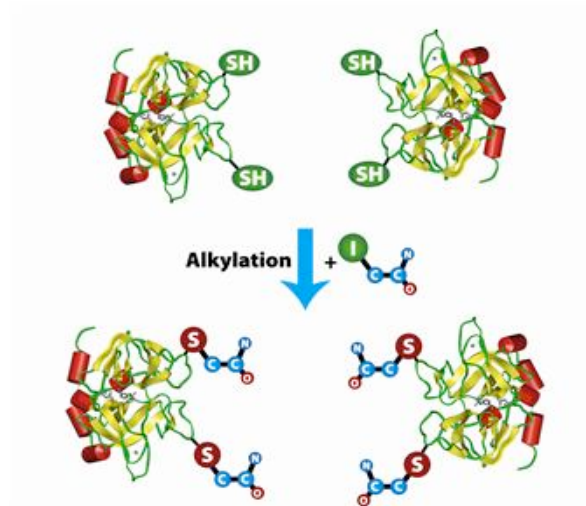
Biologiske prøver inneholder ofte komplekse blandinger av proteiner og peptider. Det finnes flere tilnærminger til hvordan slike prøver opparbeides for å kunne analyseres. I denne oppgaven ble det valgt en ”bottom up” –strategi (se figur 2-9). Strategien innebærer først en prosess hvor målproteinene isoleres for deretter å utføre en tryptisk klipp av disse proteinene til peptider ved hjelp av trypsin. Peptider er mer egnet for LC-MS/MS analyse fordi de har egnende størrelser som gir presise målinger. Peptidene kan deretter identifiseres og relateres tilbake til foreldreproteinet. Siste steg i strategien er separasjon av peptidene ved LC og deteksjon ved bruk av MS/MS [11, 29].



Figur 2-9: "Bottom up"-strategi for hCG går ut på følgende: 1) tryptisk klipp av proteinet, 2) bestemmelse av spesifikke signaturpeptider 3) fragmentering og deteksjon av disse ved bruk av MS/MS [8].

2.3.3 Trypsinering

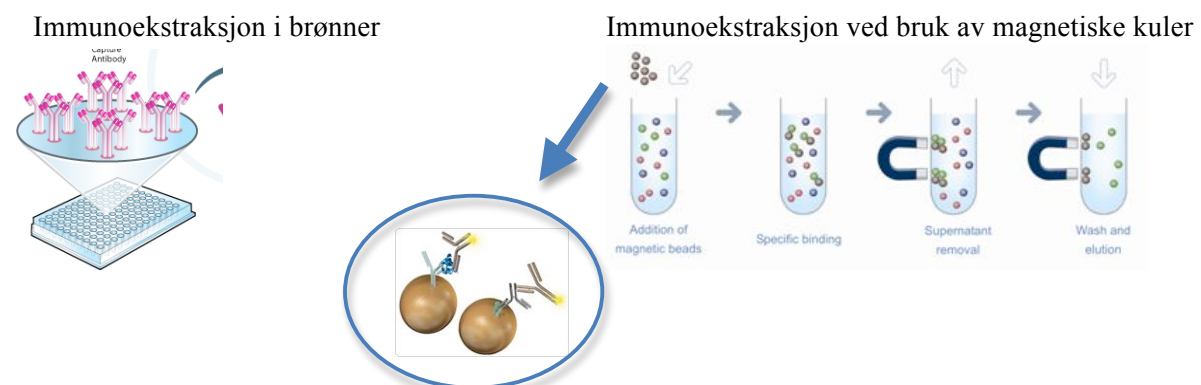
Trypsinering er prosessen hvor proteiner proteolytisk klippes opp av trypsin, til mindre peptider. Målproteiner blir gjerne isolert før de trypsineres, med for eksempel immunoekstraksjon. Trypsin utvinnes fra pankreas (bukspyttkjertelen) til gris eller storfe. Den enzymatiske klippen skjer ved kløyving av peptidbindingen mellom aminosyrer som er bundet til C-terminalen av aminosyrene lysin eller arginin, med unntak av når påfølgende aminosyre i C-terminal retning er prolin. Trypsinering av hCG genererer enkelte signaturpeptider som er helt spesifikke for hCG [11]. Det er allerede detektert og etablert signaturpeptider for hCG og hCG-isoformer, og disse er implementert i LC-MS/MS-metoden som benyttes i denne oppgaven [6]. Trypsinering inngår derfor som en del av prøveopparbeidelsen under arbeid med hCG. Før trypsineringen må disulfidbroer reduseres og deretter alkyleres (se figur 2-10). Reduksjon skjer ved oppvarming av proteinløsningen som er tilsatt Ditiotretiol (DTT), og fører til at disulfidbindingene brytes og proteinet denaturerer. Alkylering ved hjelp av Iodoacetic acid (IAA) må deretter gjennomføres rask etter reduksjon for at ikke SH-gruppene skal gå sammen igjen (se figur 2-8) [30].



Figur 2-10: Viser reduksjon og alkylering av disulfidbroer i et protein. SH er grupper som danner disulfidbindinger, disse spaltes ved reduksjon og blokkeres for redannelse av disulfidbroer ved å hekte på en alkylgruppe [30].

2.3.4 Immunoekstraksjon

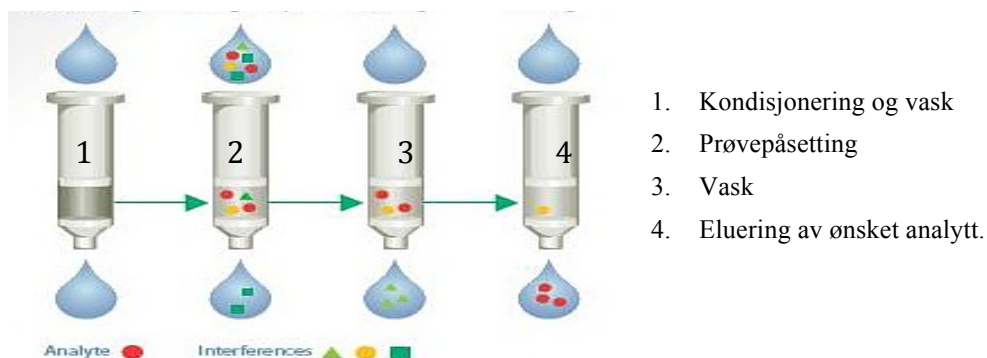
Immunoekstraksjon er en metode som benyttes for å oppkonsentrere og isolere en spesifikk målsubstans ved hjelp av antistoffer (se figur 2-11). Det er utviklet et monoklonalt antistoff, E 27 mot hCG og alle andre isoformer av hCG-molekylet [31]. Det dannes interaksjoner mellom antistoffene (som enten er festet til magnetiske kuler eller til veggen i brønner) og hCG. Ved bruk av magnetiske kuler benyttes en magnet for å isolere de magnetiske kulene mens resterende matriksløsning pipetteres vekk. Begge metodene fører til en spesifikk opprensning og oppkonsentrering av hCG-molekylene. Immunoekstraksjon er derfor en selektiv prøveoppbevaringsmetode som utnytter antistoffers selektivitet til målprotein.



Figur 2-11: Prinsipp for immunoekstraksjon i brønner og ved bruk av magnetiske kuler. I brønner er antistoffene festet til veggene mens de for magnetiske kuler er festet til overflaten av små kuler som tilsettes prøveløsningen [32, 33].

2.3.5 Fast-fase-ekstraksjon (SPE)

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) utføres for å fjerne uønskede stoffer i prøvene før de skal analyseres ved LC-MS/MS (se figur 2-12). SPE kan også benyttes til oppkonsentrering av prøvene ved å justere volumet prøvene reløses i [26].



Figur 2-12: Viser fremgangsmåten for en typisk SPE-prosedyre.

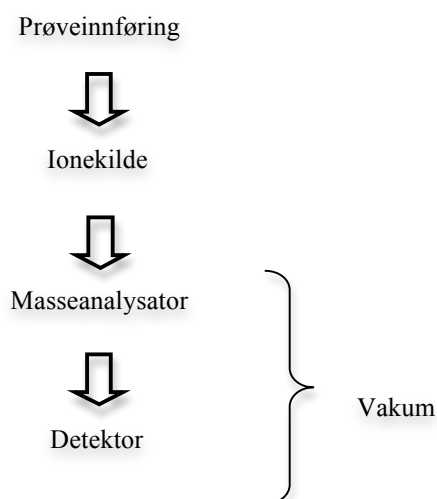
2.4 Separasjon ved hjelp av væskekromatografi

Det er benyttet væskekromatografi (LC) for separasjon av peptider. "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) forkortes ofte LC, og kalles på norsk bare væskekromatografi. Kromatografi er en fellesbetegnelse på separasjonsmetoder som benyttes for å skille stoffer fra hverandre. Det benyttes to faser, en mobilfase som beveger seg og en stasjonærfase som er i ro. I HPLC benyttes det kolonner fylt med stasjonærfase og de kan fås i mange ulike materialer avhengig av hvilke analytter som skal separeres og deres kjemiske egenskaper. I bioanalytisk sammenheng benyttes ofte et separasjonsprinsipp som baserer seg på omvendt-fase fordi det er ønskelig å separere stoffer som befinner seg i vandige prøvematrikser som blod, serum og urin. I omvendt-fase separasjon er stasjonærfasen hydrofob og mobilfasen er en vandig løsning og er dermed kompatibel med biologiske prøver. Separasjonen baserer seg på hydrofobe interaksjoner mellom karbonkjedene i kolonnematerialet og hydrofobe grupper på analytten. Etter separasjonen skal analytten detekteres og det finnes flere ulike detektorer, blant annet UV og fluorescens i tillegg til MS-deteksjon. Valg av detektor er avhengig av analyttens kjemiske egenskaper, konsentrasjonen analytten foreligger i, og hva metoden skal benyttes til. MS-deteksjon er blitt svært populært sammen med LC og benyttes i utstrakt grad i dag [26].

2.5 Deteksjon

2.5.1 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analytisk metode som detekterer stoffer i en prøve basert på molekylers masse fordelt på ladning, såkalte m/z -verdier. Det benyttes et massespektrometer for deteksjonen og disse instrumentene kan være ulikt oppbygd og inneha ulike egenskaper. Kun ladede molekyler i gassfase kan detekteres. Tradisjonelt sett ble MS benyttet til identifikasjon av organiske forbindelser. MS i kombinasjon med HPLC benyttes i stor grad til analyse av biologiske prøver. Nedenfor er det vist et oppsett av hvordan et massespektrometer kan være bygd opp (se figur 2-13) .

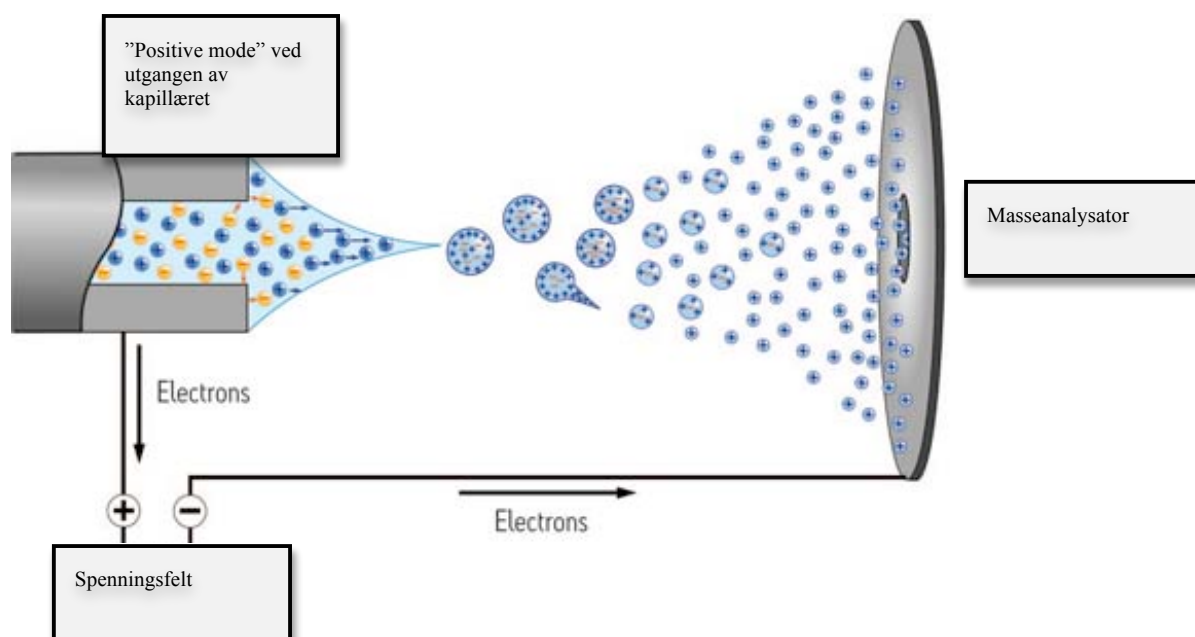


Figur 2-13: Skjematisk oversikt over prinsipp av massespektrometri.

2.5.2 Prøveinnføring og ionekilde (Elektrospray)

Det er ulike måter en prøve kan ioniseres på, og i denne oppgaven ble elektrospray benyttet. ESI (*electrospray ionisation*) er en teknikk som benyttes for å få ladede molekyler i gassfase før molekylene entrer masseanalysatoren. Molekylene blir påsatt en ladning, går fra væskefase over i gassfase, og innføres så i masseanalysatoren som ioner [34]. John Fenn fikk i 2002 nobelpris i kjemi for oppdagelsen og utviklingen av ESI som gjorde det mulig å analysere biologiske makromolekyler [35]. ESI er en ”myk ioniseringsteknikk” som fører til lite dekomponering og fragmentering av molekylet. Molekylet kan imidlertid få flere ladninger som det må tas høyde for i beregning av m/z -verdier. Når et molekyl får flere

ladninger går m/z -forholdet ned [34]. Prinsippet går ut på at en væske blir tvunget gjennom et trangt kapillær hvor enden har enten positiv eller negativ ladning. "Positive mode" er når utgangen av kapillæret har positiv ladning slik at det dannes positivt ladede ioner. Ved utgangen dannes en væskedråpe som kalles "Taylor cone", fordi den har en kjegle form. Denne eksploderer raskt grunnet høy overflatespenning, en prosess som ofte er referert til som "Coulomb explosion", og danner en fin aerosol av mindre sterkt ladede dråper. Ladningen på overflaten av dråpene vil gjøre at de beveger seg mot masseanalysatoren i det elektriske feltet. Den høye andelen av ladninger gjør igjen dråpene ustabile så de sprekker videre opp til mindre dråper. Samtidig kommer det tørkegass parallelt med kapillæret som gjør at væsken tørker opp og det kun er ladede molekyler i gassfase som når masseanalysatoren (se figur 2-14) [14].



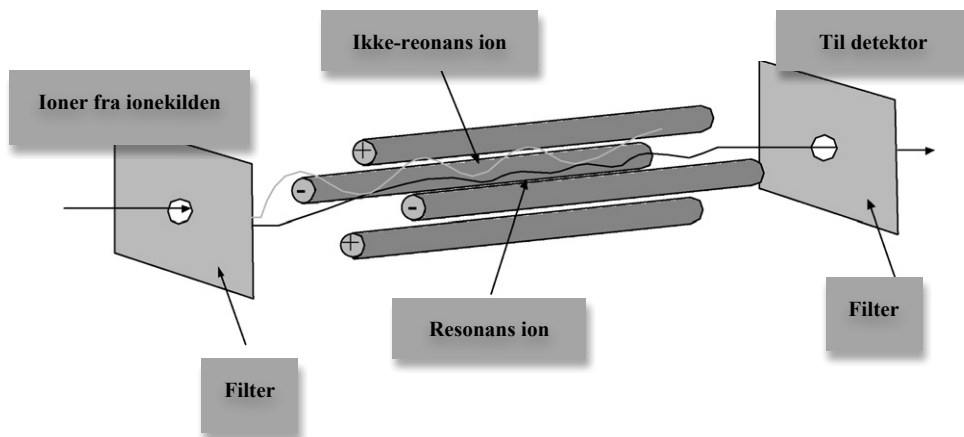
Figur 2-14: ESI i "positiv mode", som referer til at det er positiv ladning ved utgangen av kapillæret. Væsken presses gjennom dette trange kapillæret og det dannes en aerosol av små dråper, disse vandrer med spenningsfeltet. Samtidig er det tørkegass tilstede som fører til at dråpene tørker opp å eksploderer til stadig mindre dråper. Deretter når de inngangen til MS [36].

2.5.3 Masseanalysator og detektor

Masseanalysatoren måler m/z -verdiene og detektoren registrerer antall ioner per m/z -verdi [37]. Trippel kvadrupol er en type masseanalysator som består av to masseanalysatorer separert av en kollisjonscelle. Dette refereres også til som tandem MS eller bare MS/MS.

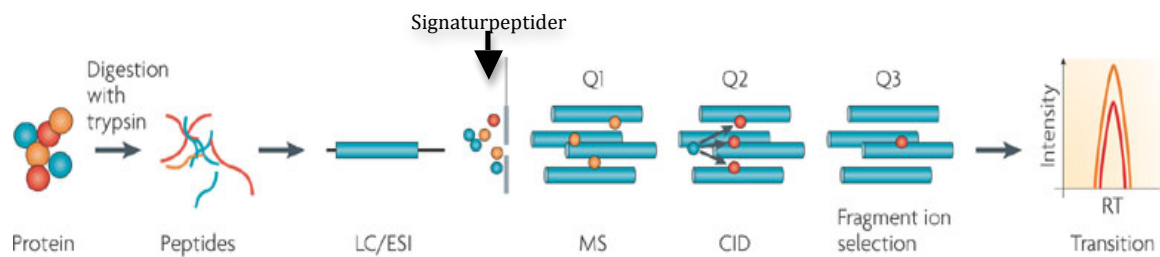
Hver kvadrupol består av fire sirkulære metallsylindere som danner et elektrisk filter som selekterer masser som slippes gjennom (se figur 2-15). Ionene blir sluppet inn i masseanalysatoren, og deretter oscillerer de langs kvadrupolene etter m/z -forholdet og variasjon av spenning og frekvens på kvadrupolene [14].

Deteksjon av hCG ved bruk av LC-MS/MS baserer seg på monitorering av signaturpeptider. Første kvadrupol selekterer peptid-massene/modermassene. Disse går deretter videre til neste kvadrupol som fungerer som en kollisjonscelle, her møter peptidene kollisjonsgass og fragmenteres. Bestemte peptidfragmenter selekteres i siste kvadrupol og detekteres. På denne måten kan MS-systemet fungere selektivt ved kun å detektere ønskede m/z -verdier.



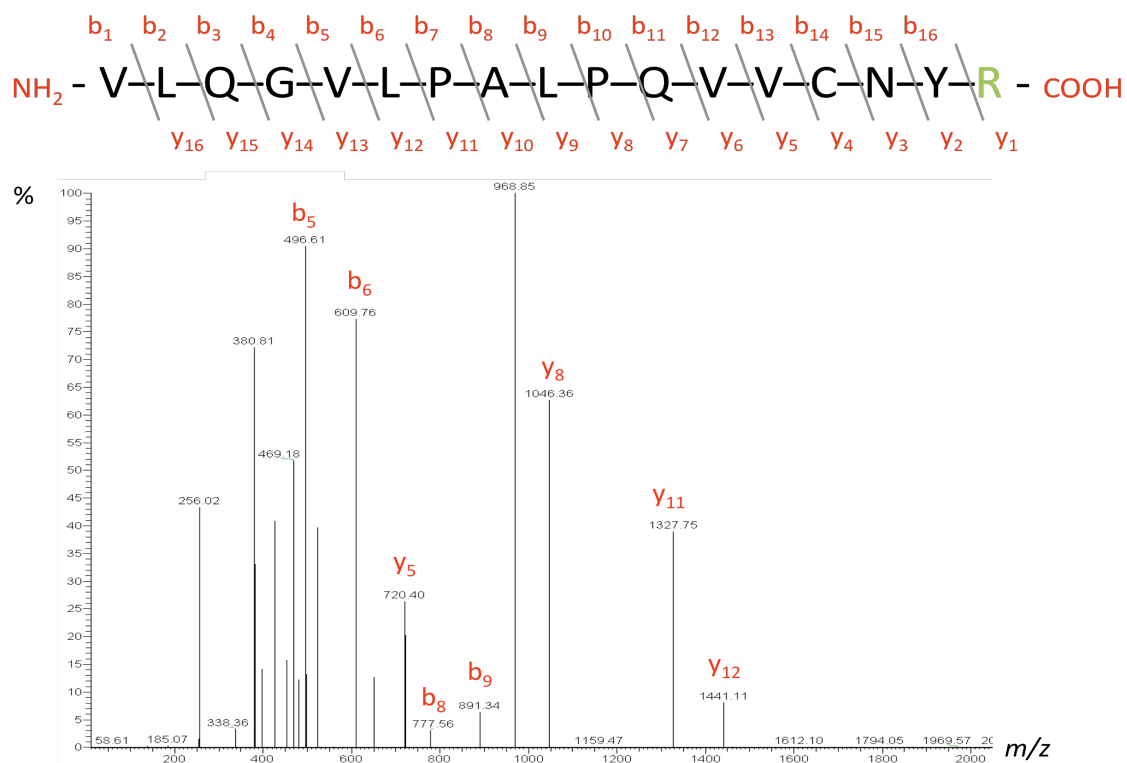
Figur 2-15: Kvadrupol masseanalysator [14].

MS/MS-metoden som benyttes i oppgaven kalles "selectiv reaction monitoring" (SRM) og er en selektiv metode som gir bedre sensitivitet (se figur 2-16). I første kvadrupol (Q1) slippes utvalgte peptider igjennom, disse fragmenteres i Q2 som fungerer som en kollisjonscelle, deretter går utvalgte peptider videre og detekteres i Q3. Kun utvalgte fragmentioner fra en spesifikk forløper blir detektert, dette gjør metoden svært selektiv ovenfor spesifikke m/z -verdier og kromatogrammene gir derfor ofte klare signaler.



Figur 2-16: Deteksjon av trypsinerte proteiner ved MS/MS og SRM. Proteinet blir ført trypsinert før det analyseres. Kun spesifikke peptider som har bestemte m/z -verdier blir selektert og detektert og gir fine kromatogrammer [38].

Fragmentionene som blir monitorert i Q3 for is β T5 og β T5 er valgt ut på bakgrunn av MS/MS spektra (se figur 2-17). MS/MS spekteret viser hvilke fragmentioner som detekteres når intern standard fragmenteres. Fragmentionene y11 og y8 ble valgt ut fordi disse forkom i relativ høy intensitet. Intern standard har en tung aminosyre i sin C-terminale ende, det er derfor nødvendig å monitorere y-fragmentioner for å kunne skille mellom lett (endogent signaturpeptid derivert fra hCG) og tungt (intern standard) signaturpeptid. Det ble også valgt tilsvarende fragmentioner for β T5. Fragmentionene er implementert i LC-MS/MS metoden som benyttes i denne oppgaven. Det er disse fragmentionene som monitoreres i tredje kvadrupol ved SRM for β T5 og is β T5.



Figur 2-17: Øverst er aminosyresekvensen til is β T5 og mulige fragmentioner. Nederst er et MS/MS av is β T5 som viser hvilke b- og y-fragmentionene som dannes, figuren er benyttet med tillatelse fra Hanne Lund.

3. Materialer

3.1 Kjemikalier, proteiner og utstyr

Følgende tabeller gir en oversikt over hvilke kjemikalier, proteiner og utstyr som er benyttet under arbeidet med denne oppgaven.

Tabell 1: Kjemikalier

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril, CH ₃ CN	>99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat NH ₄ HCO ₃	≥99,5 %	Fluka, Tyskland
DTT (ditiotretiol) C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	≥99,0 %	Fluka, India
Dinatriumfosfatdihydrat Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	>99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
IAA (Iodoacetic acid) C ₂ H ₃ IO ₃	~99%	Sigma-Aldrich inc., St Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenfosfat, KH ₂ PO ₄	Analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid, KCl	>99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Maursyre, HCOOH	98-100 %, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Metanol, CH ₃ OH	≥99,9 % , HPLC-kvalitet	VWR international, Leuven, Belgia
Natriumklorid, NaCl	>99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Saltsyre, HCl	37 %, analysekvalitet	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Tris	>99%	Fluka, Sveits
Trifluoreddiksyre	≥98%, reagent grade	Sigma-Aldrich inc., St Louis, MO, USA

Tabell 2: Proteiner

Protein	Kvalitet	Leverandør
Pregnyl [®] 5000 IE hCG per ampulle	pulver til inj.væske, oppl.	Organon AS, Nederland
Trypsin fra bovin pankreas	14408 enheter/mg fast stoff	Sigma-Aldrich inc., St Louis, MO, USA

Tabell 3: Utstyr for immunoekstraksjon

Utstyr	Modell	Leverandør
Antistoffer	E 27	Radiumhospitalet Oslo universitetssykehus, Norge
Magnetiske kuler	Dynabeads kuler [®] M-280	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Prøveblander for bruk av magnetiske kuler i løsning	HulaMixer [™]	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Immunoassaybrønner for hCG	96-wells format	Radiumhospitalet, Oslo, Norge
Magnet med plass til eppendorfrør	DynaMag [™] -2	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Tabell 4: Utstyr til LC-MS/MS

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/injektor	WPS-3000TRS	Dionex corp.Sunnyvale, CA, USA
Degasser	SR-3000	Dionex corp.Sunnyvale, CA, USA
Detektor	TSQ Quantum Access	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Programvare	Chromeleon v. 6.80 SR6	Dionex corp. Sunnyvale, CA, USA
	Xcalibur v. 2.0.7 SP1	Thermo scientific, Rockford, IL, USA
Pumper	LPG-3400M	Dionex corp.Sunnyvale, CA, USA
Separasjonskolonne	Biobasic C8 50x1 mm, 5 µm i.d	Thermo scientific,Rockford, IL, USA

Tabell 5: Øvrig utstyr, forbruksvarer

Forbruksvare	Modell	Produsent
Empore C8	Empore Extraction disks C8 47mm	Phenomenex
Eppendorfrør	1,5 mL og 2 mL	Eppendorf AG, Tyskland
Eppendorfrør LoBind for proteiner	1,5 mL og 2 mL	Eppendorf AG, Tyskland
Glass pasteur pipetter	150 mm, 230 mm	VWR
Pipettespisser	Finntip [®]	Thermo Scientific, Finland
Sentrifugerør	15 mL m/skrukork, sterile	VWR, USA

Tabell 6: Øvrig utstyr, ikke forbruksvarer

Utstyr	Modell	Leverandør
Automatpipetter	Finnpipette [®]	Thermo electron corp, Cheshire, UK Labsystems, Helsinki, Finland
Inkubatorovn	Termaks	Termax, Bergen, Norge
Inndampingsenhet (med mulighet for varme og nitrogengass)	Techne, Dri-Block [®] DB-3D	Fisher Scientific, Oslo, Norge
Thermomixer	Comfort eppendorf 1,5 mL	Fisher Scientific, Oslo, Norge
pH-meter	827 pH lab	Metrohm ion analysis, Sveits
Sentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Liten sentrifuge	Galaxy mini	VWR
Ultralydbad	Bransonic [®] 5510E	Branson, USA
Vannrenseanlegg:	Milli-Q [®] Integral 3	Millipore A/S, Norge

Vekt	XS 205 DualRange	Mettler-toledo AS, Oslo, Norge
VibraMax rystemaskin	VibraMax 100	Janke & Kunkel, IKA WERK, Staufen, Tyskland
Vortex-mixer	IKA [®] MS3 digital	Fisher Scientific, Oslo, Norge

3.2 Tillaging av løsninger og utstyr

3.2.1 Løsninger

20 mM maursyreløsning:

755 µL 100 % maursyre til 1 L ionebyttet vann.

hCG-stamløsning:

En ampulle Pregnyl[®] (5000 IE hCG) ble løst i 1 mL ionebyttet vann og overført til et LoBind eppendorfrør. Stamløsningen ble oppbevart i kjøleskap i inntil 1 uke.

hCG-spikede prøver:

hCG-stamløsning ble fortynnet ned til ønskede konsentrasjoner i henholdsvis serum og/eller urin avhengig av type eksperiment. Prøveløsningene ble laget samme dag som de skulle brukes. Spiket er et ord som benyttes om prøver som er tilsatt noe, her benyttes det om prøver som er tilsatt hCG i form av Pregnyl[®].

3.2.2 Løsninger til prøveoppbehandling

Ammoniumbikarbonat-buffer (ABC):

Denne bufferen ble laget fersk for hver dag den skulle brukes.

50 mM ABC-buffer: 40 mg ammoniumbikarbonat ble tilsatt 10 mL ionebyttet vann. Ristet på vortex mikser.

Reduksjonsreagens:

50 mM DTT-løsning: 7,7 mg DTT løst 1 mL ABC-buffer.

100 mM DTT-løsning: 7,7 mg DTT løst i 0,5 mL ABC-buffer.

Utveid tørrstoff ble tilsatt ABC-buffer rett før bruk.

Alkyleringsreagens:

200 mM IAA-løsning: 37,2 mg IAA løses i 1 mL ABC-buffer.

400 mM IAA-løsning: 37,2 mg IAA løses i 0,5 mL ABC-buffer.

Utveid tørrstoff ble oppbevart i fryser eller på is og tilsatt ABC-buffer rett før bruk. IAA er lysfølsomt og skal oppbevares beskyttet fra lys. Hansker brukes under arbeid med stoffet.

Trypsin-stamløsning 1 mg/mL:

Trypsin ble veid ut og løst umiddelbart før bruk. 1 mg trypsin ble løst i 1 mL 50 mM ABC-buffer i et LoBind-ependorfrør og ristes forsiktig til trypsin var fullstendig løst. Trypsin-stamløsningen ble deretter fortynnet til ønskede konsentrasjoner.

3.2.3 Løsninger til immunoekstraksjon

10*PBS- løsning:

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄*2H₂O, 240 mg KH₂PO₄ ble veid ut og overført til en 100 mL målekolbe, det ble fylt opp vann til 100 mL-merket og ristet til løsningen ble klar. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap. Løsningen har en høy saltkonsentrasjon som gjør at den har god holdbarhet.

PBS - løsning:

1 mL av 10*PBS løsningen ble tilsatt 9 mL ionebyttet vann. Løsningen ble laget fersk den dagen den skulle brukes.

PBS-løsning med 0,05 % Tween 20:

25 µL Tween 20 tilsettes til 50 mL PBS-løsning.

10 mM Tris-HCl:

121,8 mg tris ble løst i vann til nesten 100 mL i en målekolbe, pH ble justert til pH 7,4 med HCl /vann-løsning (1:3) og pH-meter, deretter tilsettes vann til 100 mL-merket.

3.2.4 Løsninger til SPE

10 % (v/v) trifluoreddiksyre (TFA)-løsning:

1 ampulle TFA ble overført til et reagensrør med 9 mL ionebyttet vann.

0,1 % (v/v) TFA-løsning:

100 μ L 10 % TFA-løsning ble overført til 9,9 mL ionebyttet vann.

Elueringsløsning: 20 % 0,1 % TFA-løsning, 80 % ACN

For å lage 1 mL: 200 μ L 0,1 % TFA-løsning og 800 μ L ACN.

3.2.5 Mobilfaser

Det ble benyttet 2 mobilfaser til gradienteluering i HPLC. Begge inneholdt ACN og 20 mM maursyreløsning i ulike blandingsforhold. Mobilfase A: 5 % ACN og 95 % 20 mM maursyreløsning, mobilfase B: 5 % 20 mM maursyreløsning og 95 % ACN.

Mobilfase A: 950 mL 20 mM maursyreløsning og 50 mL 100 % ACN.

Mobilfase B: 50 mL 20 mM maursyreløsning og 950 mL 100 % ACN.

Mobilfasene blandes godt, og settes på ultralydbad i ca 5 minutter for å fjerne eventuelle luftbobler.

3.3 Tillaging av utstyr

SPE-tipper:

Til SPE-prosedyren ble det benyttet egenproduserte SPE-tipper (se figur 3-1). Det ble brukt en glasspasteurpipette til å trykke ut 6 små biter av pakkematerialet (Empore extraction C8-47mm). Disse ble overført til egnede pipettespisser og dyttet forsiktig på plass ved hjelp av en metalltråd. For å samle opp væsken under SPE prosedyren settes SPE-tippene ned i et 2 mL eppendorfrør via et hull som ble laget i toppen. Rett før elueringen ble det byttet til 1,5 mL LoBind-eppendorfrør.

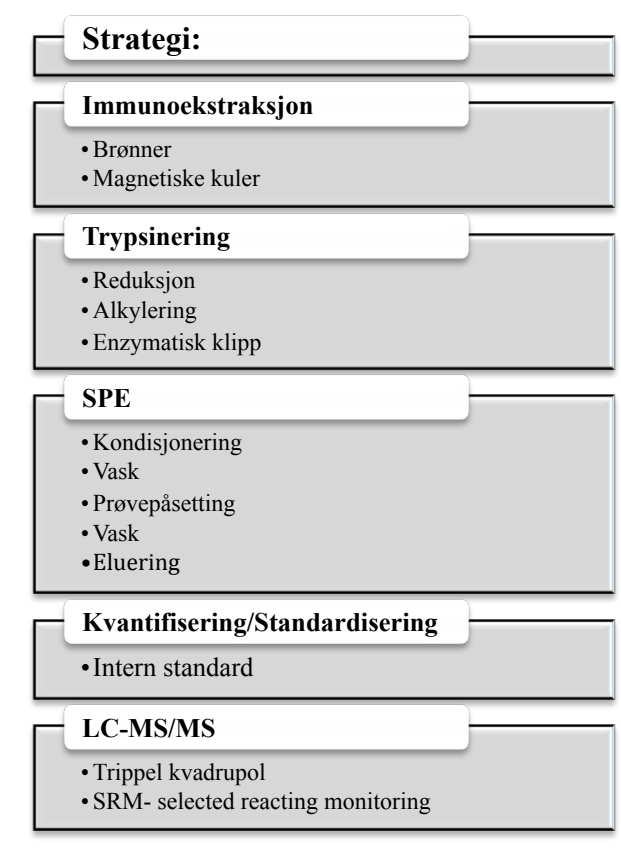


Figur 3-1:
Egenprodusert
SPE-tipp i 2 mL-
eppendorfrør.

4. Metoder

4.1 Prøveopparbeidelse for hCG-prøver i serum og urin

De overordnede prosedyrene for prøveopparbeidelse var utviklet av stipendiat Hanne Lund i samarbeid med hennes tidligere masterstudenter; Silje Bøen Torsetnes og Siri Valen Egeland (se figur 4-1). Prøvene som ble analysert var hovedsakelig serum- og urinprøver spiket med Pregnyl®.



Figur 4-1: Oversikt over strategien for prøveopparbeidelsen og hvilke metoder som benyttes.

4.1.1 Immunoekstraksjon

Det ble i oppgaven benyttet brønner og magnetiske kuler til immunoekstraksjon av hCG og hCG-isoformer. De ulike prosedyrene er beskrevet under.

Prosedyre for bruk av brønner :

Prøveløsningskapasitet: $\leq 200 \mu\text{L}$

1. $200 \mu\text{L}$ PBS med Tween 20 tilsettes hver brønn for vask.
2. Prøveløsningen fjernes med vakumsug.
3. $200 \mu\text{L}$ prøveløsning tilsettes brønnene og ristes på Vibramax ristemaskin i 1 time ved middels ristestyrke.
4. Prøveløsningen fjernes
5. Brønnene vaskes med:
 - $200 \mu\text{L}$ PBS med Tween 20 (1x)
 - $200 \mu\text{L}$ PBS (1x)
 - $200 \mu\text{L}$ 10 mM Tris-HCl (1x)

Mellom hvert vasketrinn fjernes vaskeløsningen med vakumsug

6. $200 \mu\text{L}$ ABC-buffer tilsettes hver brønn

Prosedyre for magnetiske kuler:

Magnetiske kuler er små polymerbelagte jernkuler hvor antistoffet E27 for hCG er festet på overflaten. DynaMag™-2 er en magnet som holder igjen kulene ved fjerning av løsning (se figur 4-2).

Prøveløsningskapasitet: $\leq 2000 \mu\text{L}$

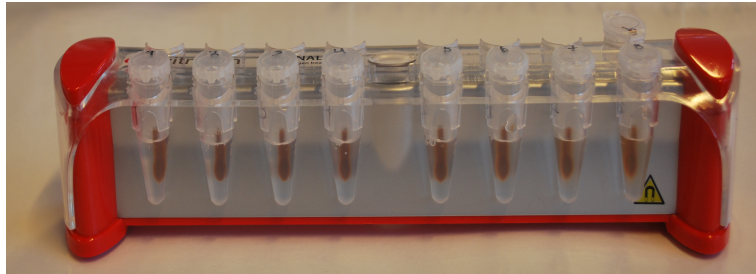
1. $500 \mu\text{L}$ PBS med tween 20 tilsettes hvert eppendorfrør.
2. Løsningen med de magnetiske kulene ristes opp på vortex mikser og $20 \mu\text{L}$ tilsettes prøverørene. På grunn av sedimentering av kulene ble løsningen ristet opp mellom hver 2. tilsetting.
3. Eppendorfrørene settes i magnet (DynaMag™-2) og vaskeløsningen fjernes med en pipette.
4. Ønsket prøvevolum tilsettes eppendorfrørene med de magnetiske kulene og ekstraheres i 1 time på HulaMixer™.
5. Prøvene settes i magneten og prøveløsningen fjernes.
6. Vask de magnetiske kulene med:
 - $500 \mu\text{L}$ PBS med Tween 20 (1x)

- 500 μ L PBS (1x)
- 500 μ L Tris-HCl (1x)

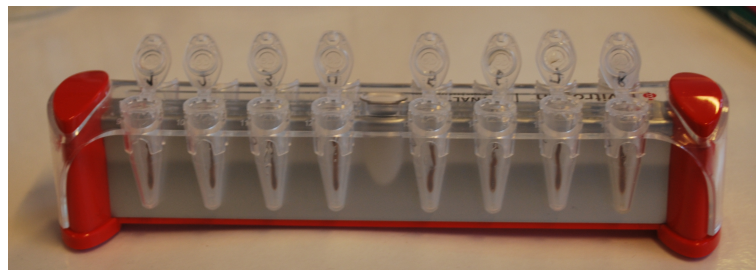
Mellom hvert vasketrinn settes prøverørene i DynaMag™-2 for fjerning av vaskeløsning.

7. 200 μ L ABC-buffer tilsettes hvert eppendorfrør

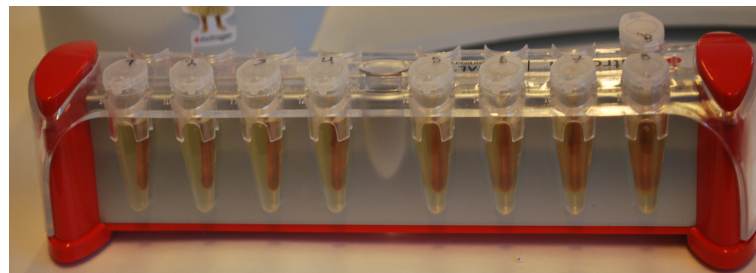
1-3) 500 μ L Tween 20 og 20 μ L magnetiske kuler er tilsatt. Eppendorfrørene er satt i DynaMag™-2 for at vaskeløsningen skal fjernes uten at kulene blir med.



4) Væsken er fjernet og kun de magnetiske kulene er igjen. Det er klart for prøvetilsetting.



5) Det ble tilsatt 1 mL urin til hvert rør.



Figur 4-2: Illustrasjon av prøveoppbehandling med magnetiske kuler og bruk av DynaMag™-2. Tallene korrelerer til prosedyren for magnetiske kuler.

4.1.2 Trypsinering

Etter immunoekstraksjonen ble prøvene reløst i 200 μ L ABC-buffer som nevnt i prosedyrene, og var klare for trypsinering.

Prosedyre for trypsinering ved bruk av brønner:

1. Reduksjon: 4 μ L 50 mM DTT-løsning tilsettes hver brønn, det legges over en varmemestabil film før brønnene settes inn i varmeskap ved 90 °C i 15 min.
2. Avkjøl til romtemperatur
3. Alkylering: 6 μ L 200 mM IAA-løsning ble tilsatt til hver brønn, og satt mørk i 15 min.
4. 4 μ L 50 μ g/mL Trypsin-løsning tilsettes hver brønn, varmemestabil film legges over brønnene før de settes inn i varmeskap ved 37 °C i 2,5 time.

Prosedyre for trypsinering ved bruk av magnetiske kuler:

1. Reduksjon: 6 μ L DTT-løsning (100 mM) ble tilsatt hvert rør som deretter ble satt i thermomixer ved 95 °C, lett risting i 20 min.
2. Avkjøl til romtemperatur
3. Alkylering: 9 μ L IAA-løsning (400 mM) ble tilsatt hvert rør, og satt mørkt i 15 min.
4. Trypsinering: 10 μ L (10 μ g/mL) ble tilsatt hvert rør rørene ble satt i thermomixer over natt eller i ≥ 18 timer ved 37 °C, lett risting benyttes for å unngå at kulene sedimenterer i for stor grad.

4.1.3 SPE

Det utføres SPE ved bruk av egenproduserte SPE-tipper med C8-materiale (se 3.3 Tillaging av utstyr). SPE fjerner reduksjons og alkyleringsreagensene som er benyttet tidligere i prøveopparbeidelsen. I tillegg oppkonsentreres prøvene ved å reløse prøvene i mindre volum enn det som ble satt på SPE-tippen.

Prosedyre for SPE:

1. Kondisjonering:
 - 100 μ L 100 % ACN
 - 100 μ L 20 mM maursyre-løsning.

2. Prøvepåsetting:

- 200 µL prøve ble tilsatt. Ved bruk av magnetiske kuler må magneten benyttes ved utpipettering av prøven for å unngå at kulene følger med prøveløsningen ved tilsetning til SPE-tippene.

3. Vask:

- 100 µL 20 mM maursyreløsning

4. Eluering:

- Før elueringen må oppsammlingsrørene fjernes og SPE-tippene overføres til nye oppsammlingsrør, LoBind 1,5 mL eppendorfrør.
- 60 µL elueringsvæske (80 % ACN, 20 % 0,1 % TFA-løsning) tilsettes hver SPE-tipp.

5. Inndamping og reløsning :

- Rørene settes i inndampningsenhet ved 60 °C med middels tilførsel av N₂-gass i 20-40 min, eller til all væsken er dampet inn.
- Prøvene ble reløst i 20 mM maursyreløsning.:
 - o For prøver med intern standard: 40 µL 20 mM maursyreløsning, 10 µL 50 pmol/mL intern standard βT5.
 - o For prøver uten intern standard: 50 µL 20 mM maursyreløsning.
 - o Volumene kan variere avhengig av om det er ønskelig med oppkonsentrering eller ikke.

SPE-prosedyren utføres i en eppendorf-sentrifuge. Hastigheten som ble benyttet 4500-5500 rpm i 2-6 minutter avhengig av væskemengden. Det ble sentrifugert mellom hvert trinn i prosedyren.

4.2 Intern standard

Det ble benyttet en intern standard (IS) som var en syntetisert isotop-analog (AQUA peptid fra Sigma) av signaturpeptidet βT5. Intern standarden ble spesialprodusert på bestilling og hadde cysteingroupper som måtte reduseres og alkyleres for å få samme egenskaper som signaturpeptid βT5 etter prøveopparbeidelsen.

Reduksjon og alkylering av intern standard ble gjort på følgende måte:

Stamløsning av intern standard (200 μL , 5 nmol/mL):

1 ampulle (inneholder 1 nmol AQUA-peptid tørrstoff) løses i 20 μL 10 % maursyreløsning.

Det ble deretter tilsatt 180 μL 0,1% maursyreløsning. Det ble ristet godt mellom hver tilsetning.

Arbeidsløsning av intern standard (1 mL, 200 pmol/mL):

40 μL av stamløsningen på 5 nmol/mL ble tatt ut tilsatt 940 μL ABC (200 mM),

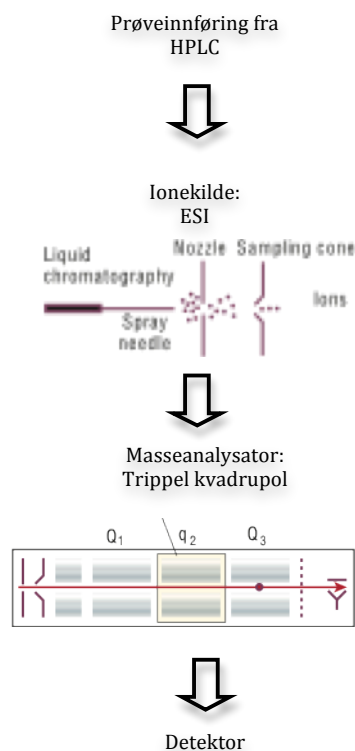
Reduksjon: 8 μL DTT (200 mM), ble tilsatt.

Alkylering: 12 μL IAA (800 mM) ble tilsatt.

Arbeidsløsningen av intern standarden ble fortynnet til 50 pmol/mL i 20 mM maursyreløsning. Denne løsningen ble tilsatt prøvene før analyse slik at konsentrasjonen av intern standard i prøvene som skulle analyseres var 10 pmol/mL.

4.3 Analyse av hCG

Alle prøver ble analysert på en trippel kvadrupol detektor med HPLC i omvendtfase som separasjonsmetode (se figur 4-3). Gradient eluering ble benyttet.



Figur 4-3: Analyseoppsett benyttet i oppgaven.

4.3.1 HPLC-parametre

Kromatografiske parametre for metoden:

Mobilfase A: 95 % 20 mM HCOOH, 5 % ACN

Mobilfase B: 5 % 20 mM HCOOH, 95 % ACN

Kolonne: Biobasic C8 50 x1 mm, 5 µm

Injeksjonsvolum: 40 µL

Flow: 50 µL/min

Flow ved rekondisjonering av kolonne: 100 µL/min

En switch-mekanisme før inngangen til MS-systemet ble benyttet slik at det kun var analyttene fra HPLC i tidsintervallet 5-16 minutter som ble ført inn i MS-systemet for deteksjon. Dette ble gjort for å unngå unødig forurensning i systemet. Denne switch-mekanismen kunne benyttes fordi elueringstidene til interessante analytter hadde lengre retensjonstid enn 5 minutter. Etter 17 min ble flowen satt opp fra 50 µL/min under analysen til 100 µL/min med 100 % MFA for rekondisjonering av kolonnen. Etter 26 minutter settes flow ned til 50 µL/min. Tabell 7 viser skjematisk hvordan gradienten foreligger.

Tabell 7: Tabellen viser gradienten bruk i LC-MS/MS metoden og hvordan de %-andelene av MFA og MFB varierer med tiden.

Tidsintervall (min)	MFA (%)	MFB (%)	Flow (µL/min)
0-8	100	0	50
8-12	60	40	50
12-12.01	54	46	50
12.01-14	5	95	50
14,01-17	100	0	50
17-26	100	0	100
26	100	0	50

4.3.2 Massespektrometriske parametre ved LC-MS/MS

MS-Parametre :

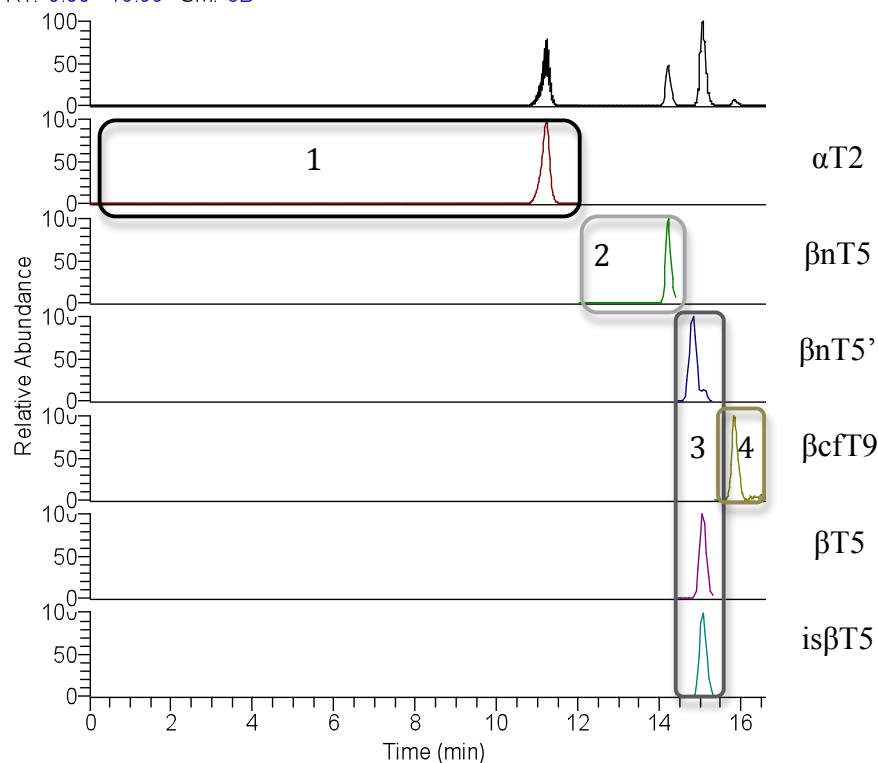
Ionisering:	ESI, Postiv mode
Kapillærtemperatur:	270 °C
Sheat gass:	Nitrogen (N ₂)
Sheat gass pressure:	10 units
Tørkegass:	Nitrogen (N ₂)
Hastighet av tørkegass:	5-10 units
CID-energi:	20-30 V
Kollisjonsgass:	Argon
Kollisjonsgasstrykk:	1,7 m Torr
Scanintervall:	0,5 sec/scan

I LC-MS/MS-programmet som benyttes i oppgaven var det valgt ut m/z -verdier for hCG-signaturpeptidene som monitoreres i Q1 og fragmentioner i Q3. For å oppnå best selektivitet og sensitivitet var programmet stilt inn på ulike tidsintervaller hvor de ulike m/z -verdiene skulle monitoreres. Disse var delt inn i scan-segmenter og illustreres i kromatogrammet til figur 4-4. (se tabell 8 for hvilke m/z -verdier som monitoreres ved de ulike tidsintervallene).

Tabell 8: MS/MS programmet som ble benyttet i denne oppgaven. Peptid-ion refererer til m/z -verdier for signaturpeptidene som dannes ved trypsineringen, og fragmentione referer til m/z -verdier for valgte fragmentioner fra signaturpeptidene. Tiden viser hvilke tidsintervall de ulike m/z -verdier monitoreres i.

Scan-segment	Peptidion m/z -verdi	Fragmention m/z -verdi	Signaturpeptid	Tid(min)	Kollisjonsenergi
1	409.300	583.400	α T2	0-12.00	20
	414.300	593.400	is α T2		
2	765.640	519.100	β nT5	12.00-	30
	765.640	659.220		12.40	
	765.640	1036.300			
3	914.650	1036.300	β nT5'	12.40-	30
	914.650	1317.800		13.30	
	964.200	1036.300	β T5		
	964.200	1317.800			
	969.300	1046.300	is β T5		
	969.300	1027.800			
4	955.670	740.000	β cfT9	13.30-	30
	955.670	924.130		15.00	

RT: 0.00 - 16.99 SM: 3B



Figur 4-4: Viser hvor de ulike scan-segmentene foreligger i kromatogrammet.

4.4 Validering

I oppgaven ble denne metoden validert: ”*Deteksjon av hCG fra urin ved bruk av magnetiske kuler og LC-MS/MS deteksjon*”. Validering ble utført etter følgende retningslinjer:

”Guidance for industry, Bioanalytical method validation”, Food and drug administration USA, May 2001 [39].

”Guideline on validation of bioanalytical methods” CHMP, EMEA, May 2010 [40].

Det ble brukt 1 mL urin som prøvevolum og 20 µL magnetiske kuler ble tilsatt hver prøve. Pregnyl[®] ble brukt ved tillaging av standard-prøvene. En ampulle Pregnyl[®] ble løst i 1 mL vann og dispensert i volumer på 50 µL i hvert Lo-bind eppendorfrør. Eppendorfrørene ble oppbevart i fryser og tint samme dag som de skulle brukes. Prøvene ble laget i ulike konsentrasjoner som alle ble fortynnet fra samme batch Pregnyl[®]. Det ble benyttet mannlig urin som ble avgitt fra samme person under hele valideringen med unntak av eksperimentene for matrikseffekter og selektivitet. Urinen ble dispensert i sentrifugerør og oppbevart i kjøleskap inntil bruk. Urinen ble sentrifugert før bruk. Nedenfor beskrives valideringsparametrene i mer detalj.

4.4.1 Nøyaktighet

Det ble gjort målinger på 3 konsentrasjoner i relevant konsentrasjonsområde 10, 100, 1000 IE/L og 5 paralleller per konsentrasjon. Det ble deretter beregnet hvor nær hver måling var den sanne verdien. Alle prøvene ble tilsatt intern standard βT5 rett før analyse. Det måles 5 punkter per konsentrasjon og det beregnes et gjennomsnitt av disse 5 punktene, gjennomsnittsverdien skal være innenfor 15 % av den sanne konsentrasjonen og ved laveste konsentrasjon kan det være 20 %.

4.4.2 Presisjon: Intradag og interdag

Presisjon er et mål for spredning og beregnes ved å utføre målinger intra- og interdag. Det ble benyttet 3 paralleller på hver konsentrasjon 10, 100, 1000 IE/L, dette ble repetert i 5 dager. Alle ble tilsatt intern standard βT5 rett før analyse.

4.4.3 Kalibreringskurve, linearitet, LLOQ og LOD

Kalibreringskurver viser forholdet mellom analyttkonsentrasjon og detektorrespons. Resultatet uttrykkes som en regresjonslinje med en tilhørende regresjonskoeffisient, r^2 . Eksperimentelt ble det benyttet 5 konsentrasjoner henholdsvis 10, 100, 1000 IE/L ($n=5$), 50 og 500 IE/L ($n=3$). Årsaken til at det er 5 paralleller kun på 10, 100, 1000 IE/L er fordi disse punktene også ble benyttet til å beregne nøyaktigheten. I tillegg ble det laget 3 blanke prøver (kun urin) og 3 null-prøver (urin + intern standard). "Lower limit of quantification" (LLOQ) og "Limit of detection" (LOD) ble estimert fra kalibreringskurven.

Kromatogrammet for de 5 parallellene med konsentrasjon 10 IE/L ble benyttet for å estimere LLOQ og LOD. Dette ble gjort ved å se på signal- støy forholdet. Kravene for LLOQ var satt til $S/N=10$ og for LOD, $S/N=3$. Det ble beregnet LOD og LLOQ for 5 paralleller og resultatet er oppgitt som gjennomsnittet av disse 5. Beregningene ble gjort på følgende måte:

LOD:

$$\text{Signal} / (3 \times \text{støy}) = \text{faktor} \rightarrow \text{Konsentrasjonen (10 IE/L)} / \text{faktor} = \text{LOD}$$

LLOQ:

$$\text{Signal} / (10 \times \text{støy}) = \text{faktor} \rightarrow \text{Konsentrasjonen (10 IE/L)} / \text{faktor} = \text{LLOQ}$$

Signal og støy er verdier som hentes fra kromatogrammene og tilsvarer signalintensitetene.

4.4.4 Utbytte

Utbytte er et mål på hvor mye hCG som er tilstede etter prøveopparbeidelsen i forhold til hvor mye som var tilstede før prøveopparbeidelsen. For å estimere utbytte ble prøver som gjennomgår hele prøveopparbeidelsesprosedyren sammenlignet med prøver som gjennomgikk trypsinering direkte i løsningen, disse sistnevnte betegnes som 100%-prøver. 100 % - prøvene har en hCG-konsentrasjon på 50 IE/mL. Prøvene tillages på følgende måte: 10 µL 5000 IE/L Pregnyl®-stamløsning tilsettes 840 µL ABC-buffer. Prøven reduseres ved å tilsette 40 µL DTT-løsning og alkyleres deretter med 60 µL IAA-løsning. 50 µL trypsinløsning 50 µg/mL tilsettes og løsningen trypsineres over natt. Deretter fortynnes 100 % - prøven ned til følgende konsentrasjoner 200, 2000, 20000 IE/L som tilsvarer konsentrasjonen som prøvene på 10, 100, 1000 IE/L teoretisk ville hatt etter oppkonsentreringstrinnene (oppkonsentreringsfaktor

på 20) hvis ikke noe forsvinner under prøveoppbevaringen. Prøvene ble tilsatt intern standard β T5 før analyse.

4.4.5 Stabilitet

Det ble totalt utført 3 eksperimenter for å teste stabilitet av hCG under ulike omstendigheter.

Stabilitet på benk:

3 paralleller av hver konsentrasjon 10, 100, 1000 IE/L. Det ble laget totalt 18 prøver, 2 x (3x3), 9 av disse skulle stå på benk ved romtemperatur i 4 timer før prøveoppbevaringen. De 9 andre ble prøveoppbevaring med en gang. Etter gjennomført prøveoppbevaring og analyse ble 0-prøvene sammenlignet med 4-timers-prøvene.

Stabilitet i autosampler:

Det ble testet for å se hvordan analyseklare prøver tåler oppbevaring i autosamplern over tid. Det ble laget 6 paralleller med konsentrasjon på 100 IE/L, etter SPE-trinnet og inndampning ble disse reløst i 20 mM maursyreløsning og intern standard tilsatt. Prøvene ble deretter fordelt i 2 vialer for HPLC, satt i autosampler og programmert til analyse direkte, og deretter hver 12.time i totalt 48 timer.

Fryse-tine stabilitet:

Det ble testet for hvor godt hCG-prøver tålte og bli fryst. Og om prøvene hadde stabil hCG-konsentrasjon etter å ha gjennomgått flere fryse- og tine-sykluser. Det ble valgt å teste to konsentrasjoner en middels på 100 IE/L og en høy på 1000 IE/L. Det ble laget 4 * 3 paralleller av hver konsentrasjon. Nedenfor er oppsettet for prøvene markert 0-4.

0: analyseres med en gang

1: fryses ned, tines og deretter analyseres

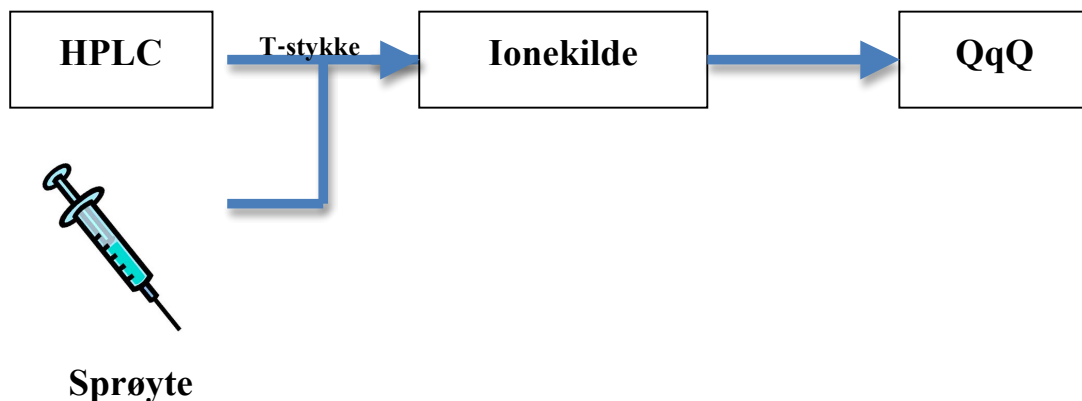
2: fryses ned, tines, fryses ned og deretter analyseres

3: fryses ned, tines, fryses ned, tines, fryses ned, tines og deretter analyseres.

Alle prøvene 0-4 hadde 3 paralleller for både 100 og 1000 IE/L. Prøvene ble satt på benk til de var helt tint. Ved flere fryse- og tine-sykluser fryses prøvene ned igjen etter tining.

4.4.6 Matrikseffekter

I biologiske prøvematrikser kan det forekomme interferenser som påvirker deteksjon av analytt. Det var ønskelig å undersøke om matriksen påvirket signalintensiteten til analytten β T5. Matriks-effekten ble testet ved: "post column infusion method" (se figur 4-5).



Figur 4-5: Oppsett for test av matrikseffekter ved "post column method". Matriksen som skal testes kommer fra HPLC, etter kolonnen blandes matriks fra HPLC med β T5-infusjonen som tilføres direkte med jevn hastighet fra sprøyta. Det benyttes et T-stykke for å føre væskestrømmen fra HPLC sammen med væskestrømmen fra sprøyta før de går inn i ionekilden. Deretter detekteres signalene i QqQ.

Dette er en metode som baserer seg på at analytten som er interessant tilføres etter kolonnen. Dette ble gjort ved å tilføre en jevn infusjon av β T5 direkte inn i MS, parallelt som blank urinprøve fra HPLC ble analysert. Det ble undersøkt om matriksen forsterket eller undertrykket signalintensiteten til β T5 som ble tilført med konstant hastighet. En sprøyte ble benyttet for tilføring av β T5 i jevn hastighet til MSen. I T-stykket blandes prøven som kommer fra separasjonskolonnen til HPLC-en og β T5. Løsningen gikk deretter inn i MSen. Signalet til β T5 vil vises som et jevnt signal i kromatogrammet. Urinprøven analyseres samtidig og det skal ses etter om β T5-signalet påvirkes ved å få økt eller senket signalrespons.

4.4.7 Selektivitet

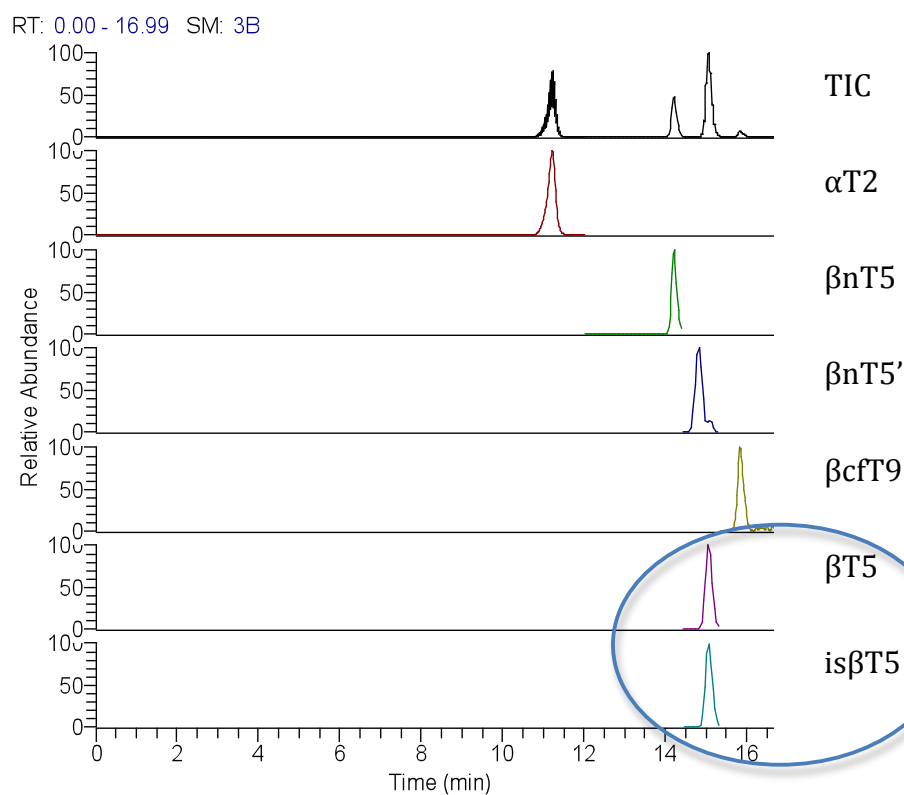
Det ble samlet inn urinprøver fra 6 mannlige personer. Det ble utført vanlig prøveoppbehandling før prøvene ble analysert. Det ble undersøkt om urinprøvene ga signaler som kunne interferere med β T5-signalet i kromatogrammet.

5. Resultat og diskusjon

Resultatene som er oppnådd i oppgaven er delt inn i fire hoveddeler hvor første del tar for seg innledende resultater, deretter presenteres optimalisering og valg av prøveopparbeidelsesmetode. I del tre presenteres valideringsresultatene og tilslutt analyseresultater fra optimalisert og validert metode benyttet på serum og urin fra gravid kvinne.

5.1 Innledning til resultater

LC-MS/MS metoden er utviklet av Hanne Lund *et al.* og baserer seg på deteksjon av flere signaturpeptider, men resultatene i denne oppgaven baserer seg kun på deteksjon av signaturpeptid β T5 og tilhørende intern standard (se figur 5-1).

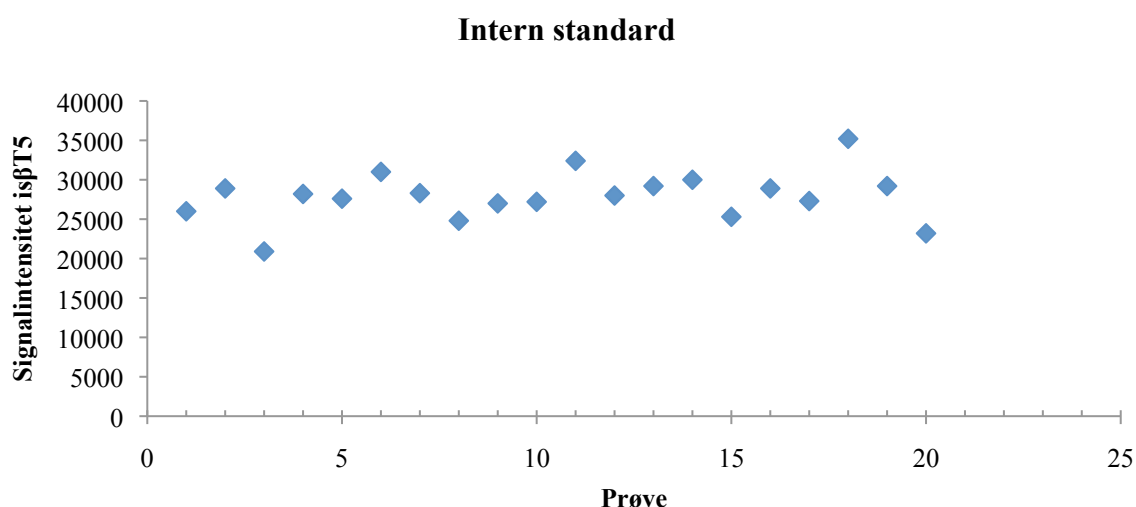


Figur 5-1: Analyse av Pregnyl[®]-spiket urin tilsatt intern standard. Toppene viser signaturpeptider som detekteres, β T5 og is β T5 benyttes til beregning av resultater og markert med en sirkel.

Kromatogrammene viser at metoden kan detektere og differensiere mellom ulike isoformer, totalt 5 forskjellige. Det har i denne oppgaven vært fokusert på deteksjon av hCG fra serum og urin i forbindelse med dopinganalyse. Det som da er interessant er om utøveren har benyttet hCG eller ikke. I dopinganalyse var det naturlig å monitorere et signaturpeptid som kom fra hCG β -subenheten fordi den er spesifikk for hCG.

5.1.1 Variasjon ved tilsetning av intern standard

Intern standard ble tilsatt hver prøve før analyse. Det var ønskelig å se om det var stor variasjon i signalintensitet for is β T5 (se figur 5-2). Variasjon i signalintensitet var relativ lav, RSD på 11,2 % for 20 prøver analysert samme dag. Det ble tilsatt 10 μ L is β T5 til hver prøve og siden dette er en relativ liten mengde kan selv små variasjoner under pipetteringen føre til variasjoner. Hadde det vært et problem med stor variasjon i signalintensiteten kunne is β T5 vært laget i lavere konsentrasjon. Slik at større volum kunne pipetteres ut og nøyaktigheten blitt bedre. Dette viste seg at dette ikke var et problem og 10 μ L ble derfor benyttet under hele oppgaven.



Figur 5-2: Punktene representerer signalintensiteten til is β T5 etter LC-MS/MS analyse. Figuren viser signalene til intern standard tilsatt til 20 prøver. (RSD= 11,2 %).

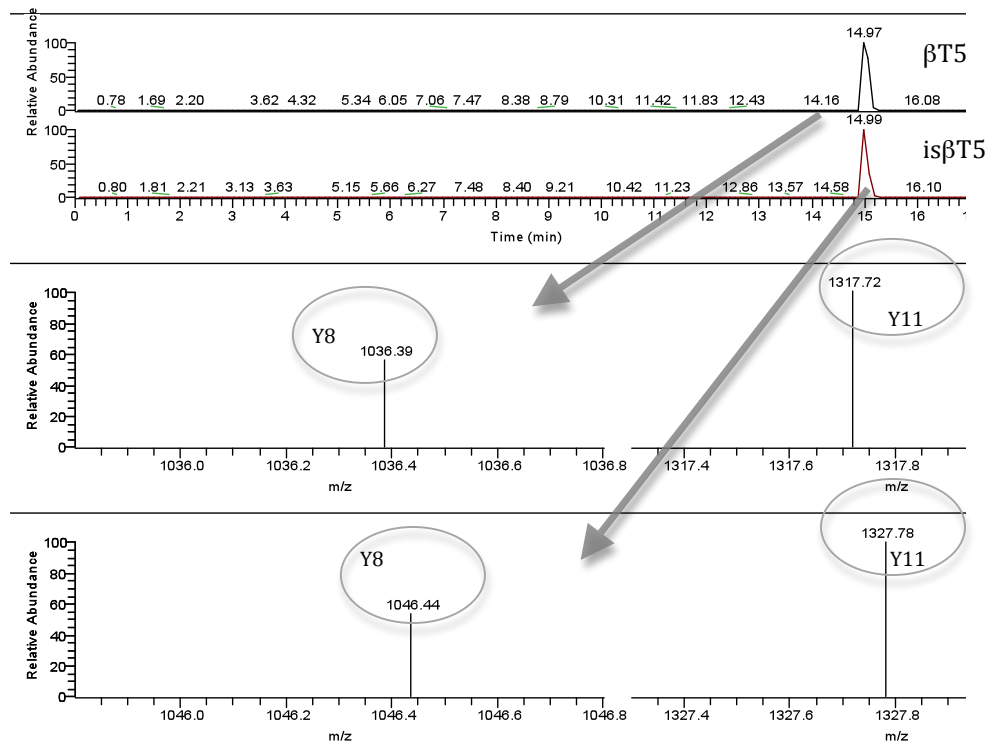
LC-MS/MS kan føre til variasjoner i signalintensitet fra analyse til analyse selv om samme prøve analyseres. Dette er ugunstig for sammenligning mellom prøver fordi det skaper usikkerhet om det er selve prøven som forårsaker variasjonen eller analyseinstrumentet. Det var derfor ønskelig å benytte intern standard for å kompensere for variasjon i signalintensitet.

Intern standard ble som nevnt tilsatt prøvene rett før analyse og vil ikke kunne kompensere for eventuelt tap av hCG i prøveoppbeidelsen.

For resultatene i denne oppgaven ble det valgt å se på ratioen mellom signalintensiteten til $\beta T5$ delt på signalintensiteten til $is\beta T5$. Dette gir et forholdstall som vil korrigere for variasjoner forårsaket av MS fra analyse til analyse, og muliggjør dermed sammenligning av prøver. Dette ble demonstrert ved å sjekke effekten ved å bruke intern standard vs å analysere uten tilsatt intern standard. En annen fordel med tilsetning av intern standarden var at analysemetoden ble mer robust og ga mulighet for kvantifisering.

5.1.2 Monitorering av fragmentioner for $\beta T5$ og $is\beta T5$

Siden bruk av intern standard for $\beta T5$ var ganske nytt ved oppstart av denne oppgaven var det ønskelig å se på hvordan bruk av denne fungerte ved analyse (se figur 5-3). Toppene for $\beta T5$ og $is\beta T5$ er kun adskilt med 0,02 i retensjonstid som er en svært liten forskjell, men differensiering mellom disse utføres av MS på grunnlag av forskjeller i masse. Massespektrene som tilhører hver topp viser at $is\beta T5$ har en m/z -verdi som er 10 masseenheter høyere enn $\beta T5$ for fragmentionene $y8$ og $y11$ (se 2.5.3 for valg av fragmentioner). Ratioen i fragmenteringsmønsteret for de to fragmentionene $y11$ og $y8$ er likt for både $\beta T5$ og $is\beta T5$. Dette viser at de to peptidene oppfører seg likt ved LC-MS/MS analyse og fragmenteres i samme grad.



Figur 5-3: Kromatogram av $\beta T5$ og $is\beta T5$ med tilhørende massespekter. $\beta T5$ og $is\beta T5$ adskilles kun med 0,02 tidsenheter i kromatogrammet. I MS-spekteret nedenfor demonstrerer fragmentationene y8 og y11 et masseskift på 10 masseenheter for disse peptidene.

5.1.3 Oppsummering fra innledende resultater

Signaturpeptid $\beta T5$ ble valgt som signaturpeptid. Det ble valgt å benytte en intern standard for å gjøre metoden mer robust og gjøre det mulig å kvantifisere hCG. Det viste seg at intern standard varierte lite og var derfor godt egnet til bruk for videre analyser. Resultater i denne oppgaven baserer seg på forholdet mellom signalintensiteten til signaturpeptid $\beta T5$ i forhold til signalintensiteten $is\beta T5$.

5.2 Valg av immunoekstraksjonsmetode

Immunoekstraksjon benyttes i prøveoppbeidelsen fordi det bidrar til isolering og oppkonsentrering av hCG fra prøvematriks. Tidligere publiserte data baserer seg på immunoekstraksjonen i brønner [6]. I denne oppgaven var det interessant å sammenligne immunoekstraksjonsmetodene ved bruk av brønner og magnetiske kuler for å sikre en sensitiv metode som er godt egnet for bruk i dopinganalyse. Det benyttes nå deteksjon ved hjelp av

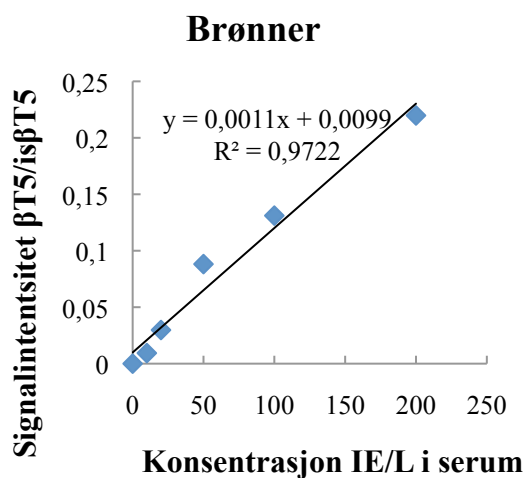
QqQ, og det forventes derfor å nå lavere deteksjonsgrenser sammenliknet med resultatene fra deteksjon ved bruk av singel kvadrupol.

Eksperimentene ble utført parallelt i serum og urin fordi begge kan være egnede matrikser for dopinganalyse. På forhånd kan det tenkes at urin er mest ideell fordi den både er enkel å samle inn, gir mulighet for større volum og det er en forholdsvis enkel biologisk matriks ut fra et analytisk ståsted. Serum derimot er mer komplisert fordi den inneholder mer proteiner. I tillegg kreves det kvalifisert personell for blodprøvetaking.

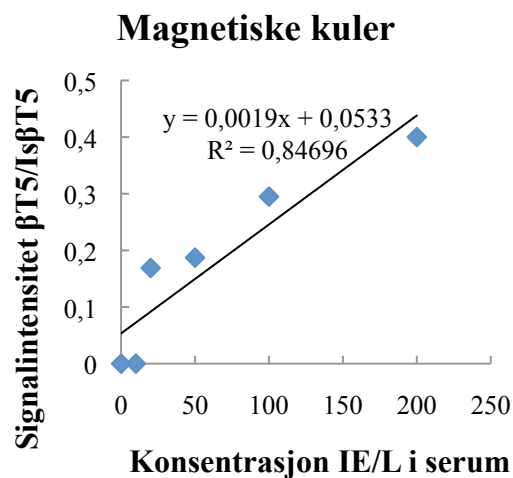
5.2.1 Kalibreringskurver ved bruk av brønner og magnetiske kuler

Det første som var ønskelig å teste var om spikede serum- og urinprøver ga lineære kurver i et bestemt konsentrasjonsområdet ved bruk av brønner og magnetiske kuler. Pregnyl[®]-spikede prøver i konsentrasjonene 10-20-50-100-200 IE/L ble derfor testet i serum og urin (se figur 5-4). Kalibreringskurver er grafer som sier noe om forholdet mellom konsentrasjon og signalrespons, og er basert på forhold mellom signalintensiteten til ratioen $\beta T5/is\beta T5$. Kalibreringskurvene for urin ga best r^2 -verdier, henholdsvis 0,986 ved bruk av brønner og 0,989 ved bruk av magnetiske kuler. Serum ga r^2 -verdier på 0,971 for brønner og 0,847 for magnetiske kuler. Det kan tyde på at urin er bedre egnet som matriks enn serum. For urin var det liten forskjell mellom brønner og magnetiske kuler, og begge metoder kunne være godt egnede. Resultatene er likevel ikke tydelige nok til å fremheve hvilken metode eller matriks som egner seg klart best. Det eneste resultatet som skiller seg negativt ut er serum ved bruk av magnetiske kuler som har en r^2 -verdi på 0,84. Det er vanskelig å si noe om årsaken til dette, men det er tydelig at punktene som danner kurven varierer mye mer og derfor gir en dårligere korrelasjon. Det er i dette eksperimentet benyttet kun to paralleller per konsentrasjon. Det kan diskuteres om resultatene kunne vært bedre hvis det var flere paralleller per konsentrasjon. Bruk av få paralleller gjør at kurven blir sårbar for variasjoner fra prøve til prøve. Det benyttes intern standard for å unngå for store variasjoner skapt av MS instrumentene, men andre variasjoner kan allikevel forekomme. De andre kurvene har imidlertid god r^2 -verdi selv om de også kun har to paralleller så det kan ikke med sikkerhet sies at dette er årsaken til den dårlige korrelasjon ved bruk av serum og magnetiske kuler.

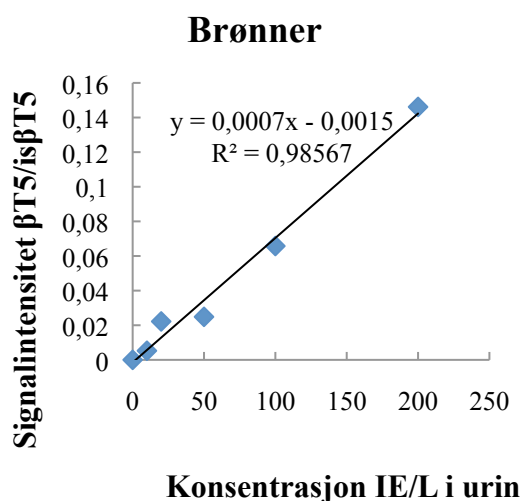
a)



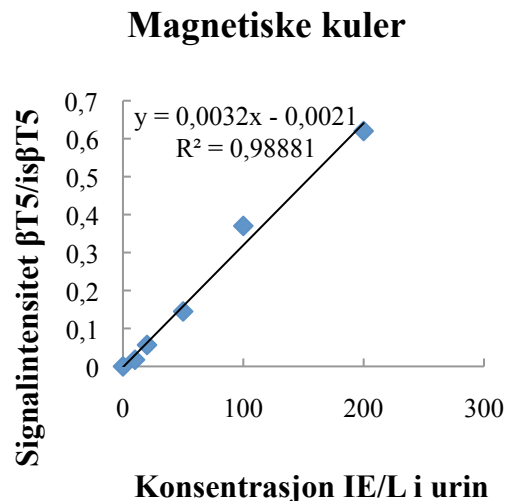
b)



c)



d)



Figur 5-4: Kalibreringskurver for immunoekstraksjon utført med enten magnetiske kuler eller brønner, på serum- og urinprøver.

5.2.2 LOD for hCG ekstrahert fra serum og urin ved bruk av brønner og magnetiske kuler

Analysemetoder til bruk i doping er avhengig av å kunne detektere svært lave konsentrasjoner av analytten. Et av delmålene med oppgaven var å finne en metode som kunne oppnå lavest mulig LOD for hCG fra biologiske prøver. For å undersøke dette ble eksperimentene utført ved å fortynne prøver spiket med Pregnyl® ned til 2 IE/L. Det ble deretter utført

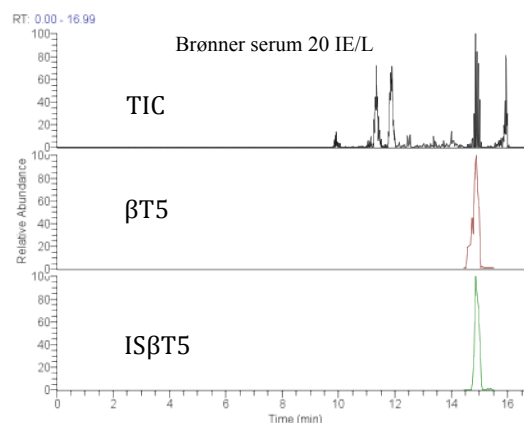
immunoekstraksjon og analyse på disse prøvene (se tabell 9 for LOD-verdier og figur 5-5 for tilhørende kromatogrammer).

Tabell 9 : Oversikt over LOD i serum og urin ved bruk av brønner og magnetiske kuler.

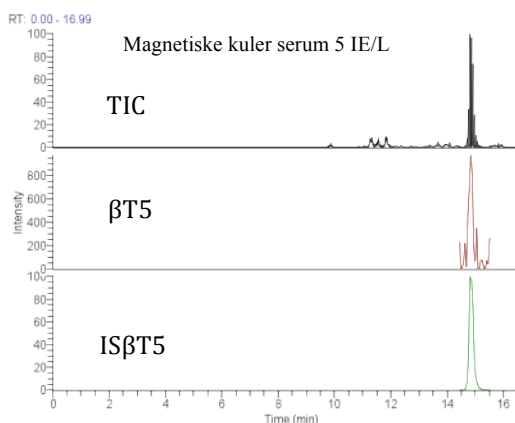
Immunoekstraksjonsmetode (prøvevolum)	Brønner (200 µL prøve)	Magnetiske kuler (20 µL magnetiske kuler, 1 mL prøve)
Matriks		
Serum	LOD: 20 IU/L	LOD: 5 IU/L
Urin	LOD: 10 IU/L	LOD: 2 IU/L

Kromatogrammene viser "total ion count" (TIC), β T5 respons og is β T5 respons oppnådd i serum og urin ved LOD.

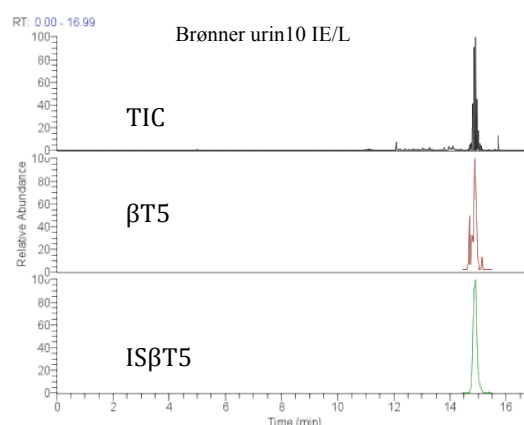
a)



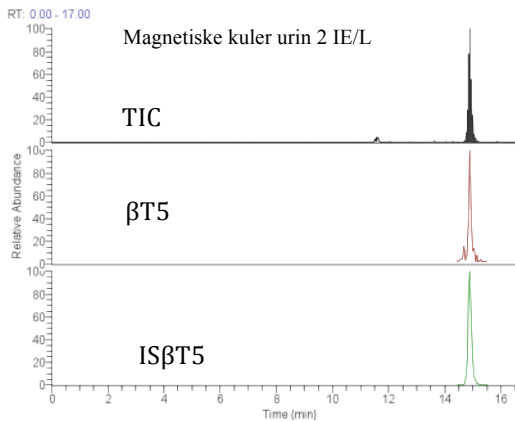
b)



c)



d)



Figur 5-5: Kromatogrammer for LOD-verdiene.

Kromatogrammene viser signalene for β T5 ved ulike hCG-konsentrasjoner som ligger ved LOD. TIC viser støynivået i kromatogrammene. Støy er et uttrykk som benyttes innen analyse for uspesifikke topper og signaler som gjør grunnlinjen i kromatogrammene ujevne. Is β T5 utgjør et fint og høyt signal i alle kromatogrammene; det er fordi det er tilsatt samme mengde intern standard til alle prøvene rett før LC-MS/MS analyse, og konsentrasjonen er høy nok til at signalet holder seg stabilt fra analyse til analyse.

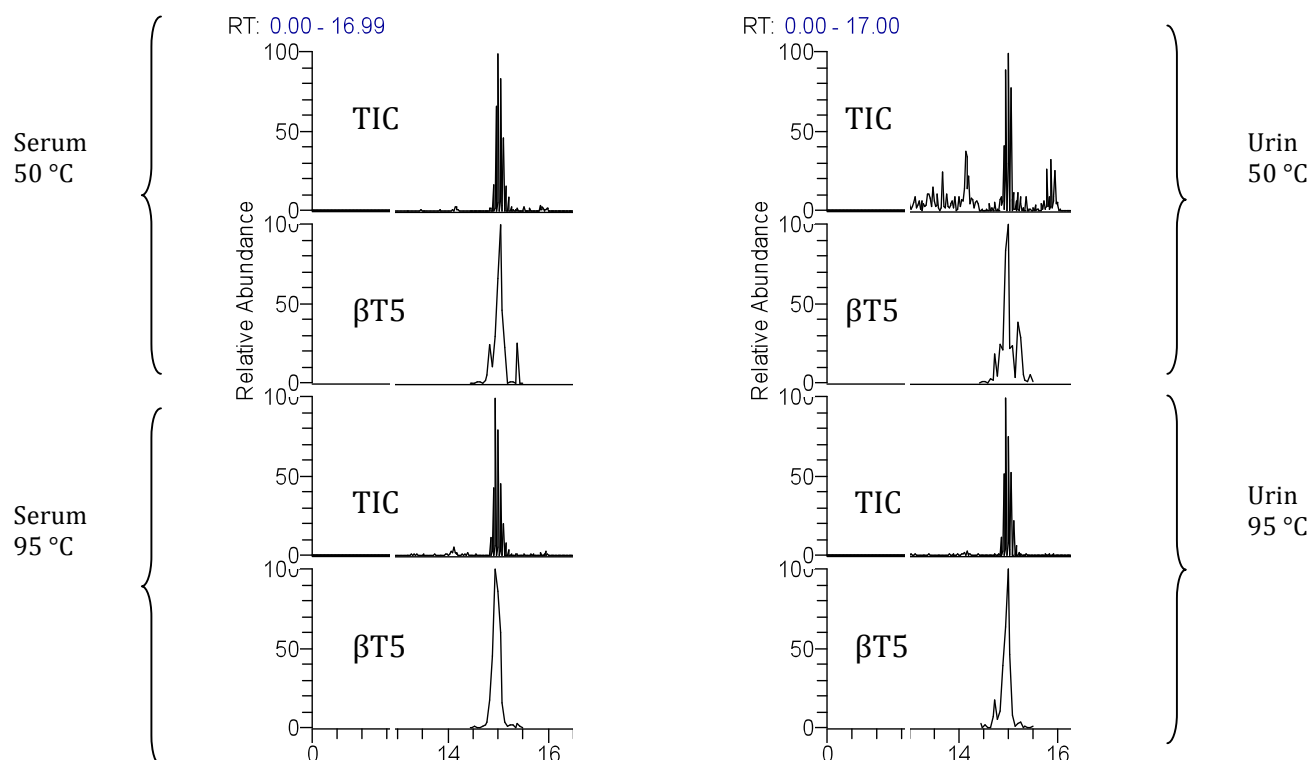
Resultatene viser at det er urin som matriks og magnetiske kuler som ekstraksjonsmetode som gir best resultat med en LOD-verdi på 2 IE/L. Kromatogram *d* viser at toppsignalet er svært godt i urin og uten antydning til støy. Generelt sett er det noe mer støy i kromatogrammene fra serumprøvene sammenlignet med urinprøvene. En årsak til at dette er sannsynligvis at serum er en matriks som inneholder en større andel proteiner enn urin. Antistoffene skal i utgangspunktet være spesifikke for hCG og hCG-isoformer. Det forekommer allikevel uspesifikk binding av andre proteiner til antistoffet som det ikke lykkes å vaske bort; dette fører til støy i kromatogrammet.

En av årsakene til at LOD-verdiene er lavere for immunoekstraksjon i brønner er sannsynligvis at brønnene har en prøvevolumkapasitet på maksimalt 200 μ L i hver brønn. Bruk av magnetiske gjorde det mulig å benytte et høyere prøvevolum. Dette gjør at det er større mulighet til variasjon og fleksibilitet ved bruk av magnetiske kuler enn brønner. Ulikt prøvevolum ble regnet å være hovedårsaken til at de oppnådde LOD-verdier. Som det også fremgår av tabell 9 ble den laveste LOD verdien på 2 IE/L oppnådd ved bruk av 1 mL urin. I urin ble det ved bruk av brønner oppnådd en LOD verdi på 10 IE/L. Mellom 2 IE/L og 10 IE/L er det en faktor 5 forskjell, tilsvarende er det mellom volumet på 0,2 mL og 1 mL.

Det et krav fra World anti-doping agency (WADA) om at analysemetoder som skal benyttes i dopingsammenheng må kunne detektere hCG i konsentrasjoner ned i 5 IE/L [3]. Dette kravet ble tilfredsstilt ved bruk av magnetiske kuler. Det velges derfor å gå videre med magnetiske kuler som immunekstraksjonsmetode. Både serum og urin har lave nok deteksjonsgrenser ved bruk av magnetiske kuler, og det ble derfor valgt å fortsette med begge matriksene.

5.2.3 Effekt av temperatur på reduksjon av hCG med magnetiske kuler

Det ble testet om det kunne oppnås lavere støyintensitet i kromatogrammene ved å redusere temperaturen under reduksjonen fra 95 °C til 50 °C. Det ble, for hver temperatur, utført 2 paralleller for både serum og urin tilsatt hCG i konsentrasjon på 20 IE/L (se figur 5-6).



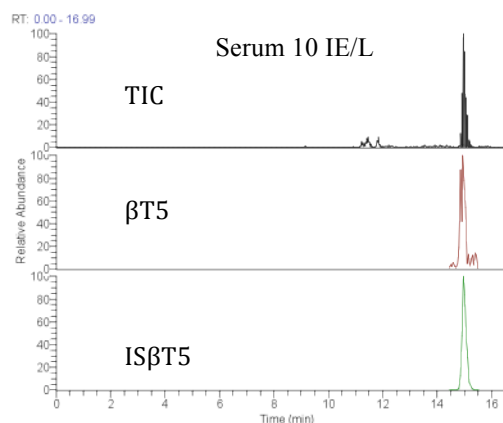
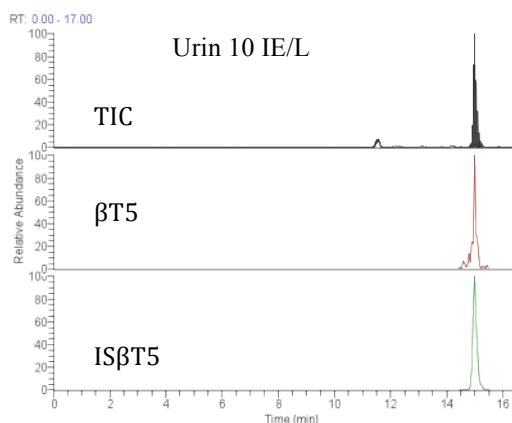
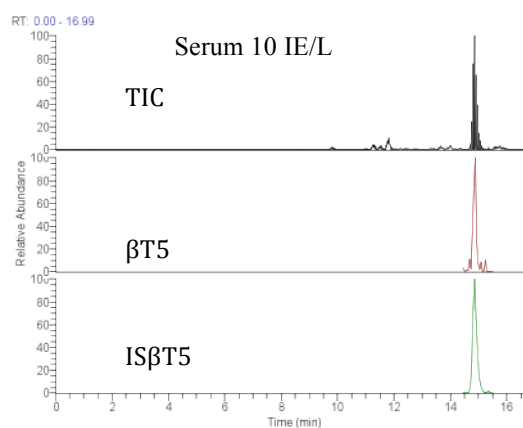
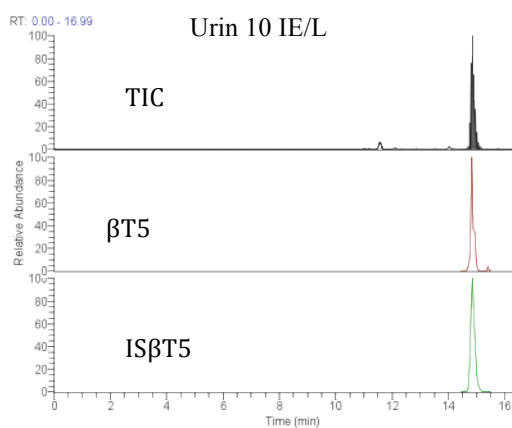
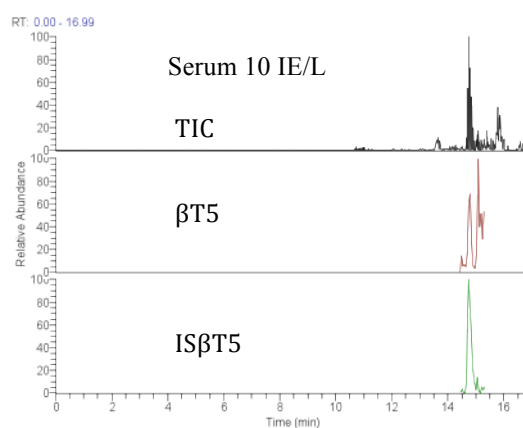
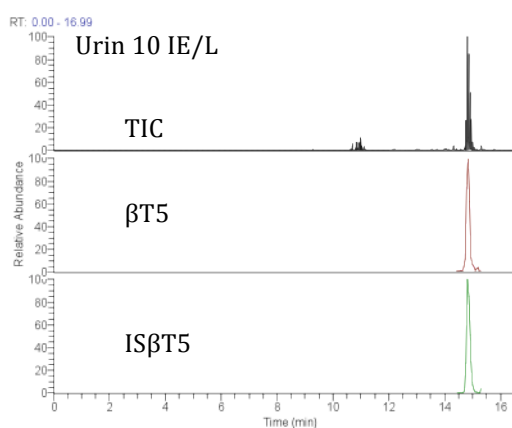
Figur 5-6: TIC og βT5 i serum og urin etter reduksjon utført ved ulike temperaturer.

Kromatogrammene viser TIC, som er alle signalene totalt og benyttes for å sammenligne total støy. Det var interessant å undersøke om signalintensiteten til βT5 varierte eller ble bedre ved lavere reduksjonstemperatur. Kromatogrammene for TIC i urin ved 50 °C har mest støy sammenlignet med de andre kromatogrammene. βT5-toppen har mer antydning til støy for prøvene som var redusert ved 50 °C sammenlignet med prøvene som ble redusert ved 95 °C. Det var ingen tegn som tydet på å utføre reduksjonen ved lavere temperatur ga lavere støyintensitet og det ble derfor konkludert med å fortsette med 95 °C.

5.2.4 Optimalisering av prøvevolum ved bruk av magnetiske kuler

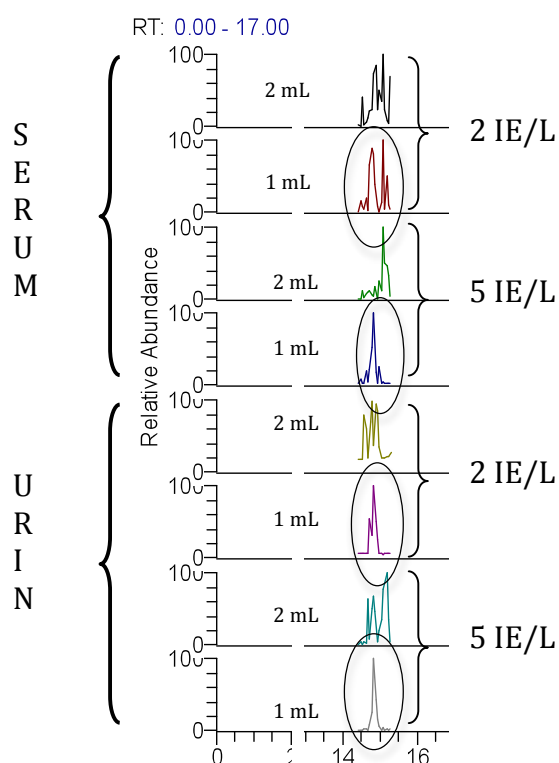
Det ble gjort flere eksperimenter for å undersøke mulighetene for å optimalisere immunoekstraksjonsmetoden for magnetiske kuler i størst mulig grad. En fordel ved bruk av magnetiske kuler er at det gjør valg av prøvevolum mer fleksibelt. I motsetning til brønner som har antistoffene festet til veggen har magnetiske kuler antistoffene immobilisert på overflaten av kulene. Kulene er suspendert i en væske ved lagring som innehar en bestemt tetthet. Kulene kan pipetteres ut ved hjelp av en automatpipette og over i ønsket prøveopparbeidelsesmatriks. Optimal mengde prøvematriks måtte etableres.

Det ble testet ulike prøvevolum for å finne det volumet som ga best resultater for metoden med tanke på sensitivitet og deteksjonsgrense. Det ble fortsatt utført parallelle eksperimenter i både serum og urin selv om det var tidligere bevist at urin var den matriksen som genererer lavest LOD-verdi. Dette for å skape mer kunnskap om hver enkel matriks. I hvert eksperiment ble det analysert prøver i konsentrasjonsområdet 2-20 IE/L for 1 mL og 2 mL prøvevolum, og 10-200 IE/L for 0,5 mL. Resultatet fra analyse av disse prøvene er presentert som kromatogrammer (se figur 5- 7).

a) 0,5 mL**b) 0,5 mL****c) 1 mL****d) 1 mL****e) 2 mL****f) 2 mL****Figure 5-7a-b: 0,5 mL prøvevolum. c-d: 1 mL prøvevolum, e-f: 2 mL prøvevolum.**

Prøvene av ulikt volum ble sammenlignet ut fra hCG-konsentrasjon på 10 IU/L, siden denne konsentrasjonen var tilgjengelig for alle disse prøvene. Kromatogrammene viser at signalet til β T5 er best i prøvene hvor det var benyttet et volum på 1 mL prøve. Sammenlignes serumprøvene med urinprøvene var det tydelig å se at signalene fra serum hadde større antydning til støy rundt signalet enn prøvene fra urin. Dette var spesielt utpreget for prøvene hvor 2 mL prøvevolum var benyttet. Signalet til intern standarden ga topper som var uten forstyrrelse i alle prøvene.

Det var på forhånd forventet at det kunne oppnås bedre sensitivitet ved å ekstrahere hCG fra et større volum, som 2 mL. Det ble analysert prøver i konsentrasjonsområdet 2-20 IE/L som nevnt ovenfor og det ble gjort en sammenligningen mellom eksperimentene som var utført med 1 mL og 2 mL prøvevolum. Det var ønskelig å sammenligne de laveste konsentrasjonene for å se hvilket prøvevolum som ga best resultat (se figur 5-8).



Figur 5-8: Signalet til β T5 i 2 IE/L og 5 IE/L for serum og urin. Signalene som er markert med en ring er fra 1 mL prøvevolum og viste seg å gi best resultat.

I figur 5-7 så det ut som om 2 mL prøve kunne gi gode signaler for β T5 i urin, men dette var ved konsentrasjonen 10 IE/L. I figur 5-8 viser kromatogrammene for β T5 (2 mL prøvevolum, konsentrasjon 2 og 5 IE/L) mye støy; signal-støy ratioen blir for høyt til at β T5 signalet kan regnes som en topp. De beste resultatene ble oppnådd ved bruk av 1 mL prøve.

I tabell 10 er resultatene fra eksperimentene oppsummert. Her ser vi hvilke LOD-verdier de ulike prøvevolumene genererte.

Tabell 10: Oversikt over oppnådde LOD-verdier i serum og urin.

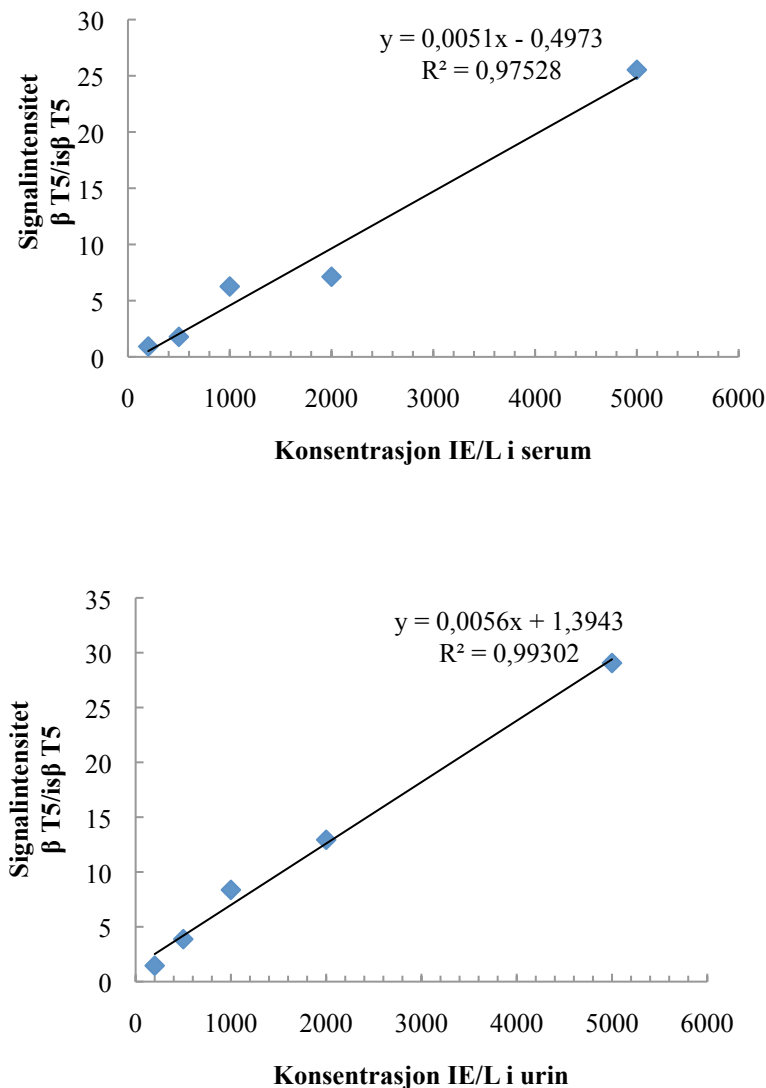
Matriks	Prøvevolum (mL)	LOD (IE/L)
Serum	0,5	10
	1	5
	2	20
Urin	0,5	10
	1	2
	2	10

For alle disse eksperimentene med ulike volum ble det utført 2 paralleller per konsentrasjon i de to matriksene. Tabellen viser at økning av prøvevolumet fra 1 mL til 2 mL ikke ga lavere verdier for LOD. En årsak til dette kan være at det ved større mengde prøvevolum også forekommer mer ”uspesifikk” binding til antistoffene som nevnt i 5.2.2. Det kan også tenkes at 2 mL er for stort prøvevolum for 20 μ L magnetiske kuler slik at de magnetiske kulene ikke klarer å fordele seg jevnt i prøvematriksen og dermed ikke kommer i kontakt med alt hCG som er tilstede i prøven. Her kunne vi valgt å teste økende mengde kuler tilsatt økende prøvevolum. Dette ble imidlertid prioritert bort da vi i neste del av eksperimentserien (se nedenfor) har valgt å teste kapasiteten til kulene som befinner seg i kulevolumet på 20 μ L. Det å velge et lavere volum av magnetiske kuler er ikke aktuelt da dette av erfaring kan medføre dårligere reproduserbarhet grunnet unøyaktigheter relatert til pipettering av små volum.

Med tanke på at hCG kan forekomme i svært lave konsentrasjoner er det gunstig å benytte et volum som gjør det mulig med stor grad av oppkonsentrering, noe 1 mL volum gir. På bakgrunn av dette og demonstrerte resultater velges det derfor å utføre metoden med 1 mL prøvevolum og 20 μ L magnetiske kuler.

5.2.5 Metningseksperiment med magnetiske kuler

For å kunne si noe om kapasiteten til kulene og gjøre grov vurdering av hvorvidt 20 uL kuler faktisk er adekvat mengde kuler å benytte i denne analysemetoden, var det interessant å undersøke når kulene ble mettet ved å gjøre eksperimenter med høye hCG-konsentrasjoner. Eksperimentet ble utført med 2-3 paralleller i serum og urin, over konsentrasjonene 200-500-1000-2000-5000 IE/L (se figur 5-9). Det var ingen tendens til utflatning i grafen for hverken urin eller serum. Kurven for urin hadde en r^2 -verdi på 0,993, og for serum r^2 -verdi på 0,9753. Dette tyder på det er linearitet i konsentrasjonsområdet 200-5000 IE/L. Skulle prøvene som analyseres være over 5000 IE/L må de fortynnes for å kunne kvantifiseres. Dette er imidlertid svært høye hCG-konsentrasjoner og vil sjeldent være aktuelt å kvantifisere nøyaktig.



Figur 5-9: Plott for metningseksperiment i serum og urin.

5.2.6 Oppsummering

Trenden som gikk igjen i eksperimentene var at urin ga best resultater sammenlignet med serum. Magnetiske kuler var å foretrekke fremfor brønner fordi det var mulig å øke prøvevolumet og lavere LOD-verdier ble oppnådd. LOD var på 2 IE/L i urin ved bruk av magnetiske kuler. Ulike mengder prøvevolum ble testet, samt kapasiteten til mengde kuler ble sjekket, og det ble valgt å benytte 20 µL magnetiske kuler til 1 mL prøvevolum urin. Magnetiske kuler viste linearitet i konsentrasjonsområder opp til 5000 IE/L, og ved konsentrasjoner høyere enn dette bør prøven fortynnes.

Disse resultatene samsvarer med hva som på forhånd var forventet. Det var tenkt at urin kunne være det mest egnede matriksen fordi den er enklere og inneholdt mindre forurensninger enn serum. I tillegg vil urin være å foretrekke innen dopinganalyse da det muliggjør enkel prøveinnsamling i tillegg til at det er uproblematisk å fremskaffe store prøvevolum.

5.3 Validering

Validering ble utført over en 2-3 ukers periode etter at metoden var ferdig optimalisert. Det ble utført validering på immunoekstraksjon med magnetiske kuler fra urin.

5.3.1 Nøyaktighet

Metoden ga god nøyaktighet og innfridde kravet på innen 15 % av sann verdi. Nøyaktigheten er angitt som prosent utbytte i forhold til sann verdi [26]. Resultatene er presentert i tabell 11 nedenfor.

Tabell 11: Tabell over nøyaktighetsresultatet. Det viser prosentvis utbytte i forhold til sann verdi. Beregningene er gjort fra gjennomsnittsverdien til fem punkter.

Tilsatt Pregnyl [®] konsentrasjon (IE/L)	Nøyaktighet (%) Intradag (n=5)
10	104
100	98
1000	100

5.3.2 Presisjon intra- og interdag

Presisjon ble målt både intra- og interdag for å få et mål på tilfeldige feil. Kravet for valid metode er at relativt standardavvik (RSD) ikke skal overstige 15 % for 100 og 1000 IE/l og 20 % for 10 IE/L. Resultatene er presentert i tabell 12. .

Tabell 12: Tabell som viser RSD for tre ulike konsentrasjoner intradag og interdag.

Tilsatt Pregnyl® konsentrasjon(IE/L)	Intradag (n=5 paralleller)	Interdag (n=5 dager)
	Presisjon (RSD %) (n=5)	Presisjon (RSD %) (n=5)
10	9	14
100	12	30
1000	10	19

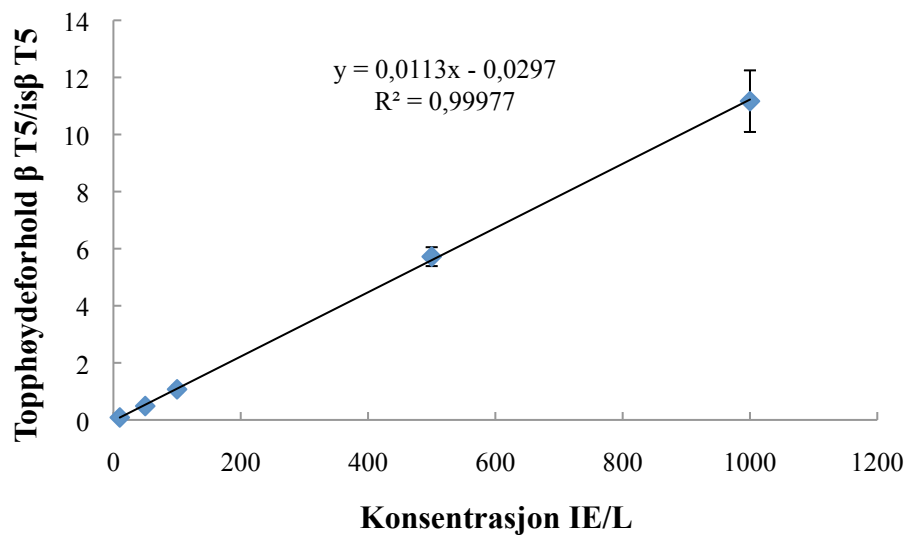
Intradag presisjonen var innenfor kravet på 15 % RSD for alle konsentrasjonene. For interdag var det kun 10 IE/L som innfridde kravet til RSD ved at den var innenfor 20 % for laveste konsentrasjon. For 100 og 1000 IE/L var kravet at de skulle være innenfor 15 % og dette var de ikke.

Det var ikke overraskende at interdag viste større variasjon enn intradag fordi det kan være mange faktorer som bidrar til variasjon fra dag til dag.

Dette resultatet betyr ikke at metoden ikke kan benyttes, men det viser viktigheten av å kjøre en kalibreringskurve for hver dag prøver skal analyseres. For denne metoden kan det konkluderes med at det beste vil være å kjøre en kalibreringskurve for hver dag metoden skal benyttes.

5.3.3 Kalibreringskurve, linearitet, LOD og LLOQ

Kalibreringskurven er et mål på lineariteten til metoden, og demonstrerer i hvilken grad metoden er i stand til å generere signalintensiteter fra målanalytten som kan relateres direkte til den faktiske konsentrasjon av nevnte analytt i prøven (se figur 5-10). Kurven oppfyller kravet om en r^2 -verdi $> 0,999$.



Figur 5-10: Kalibreringskurve i konsentrasjonsområdet 10-1000 IE/L med standardfeil.

Metoden viser god linearitet i konsentrasjonsområdet 10-1000 IE/L. Estimering av LOD og LLOQ gjøres fra de nederste punktene i kalibreringskurven, 10 IE/L som beskrevet i 4.4.3. Estimerte LOD- og LLOQ-verdier er presentert i tabell 13.

Tabell 13: Viser estimerte LOD- og LLOQ-verdier for hCG i urin oppgitt i IE/L.

LOD (IE/L)	LLOQ (IE/L)
1,35	4,52

Verdiene er basert på gjennomsnittet av 5 målinger. LOD på 1,35 IE/L tilsier at metoden kan detektere hCG ned i dette lave konsentrasjonsområdet. LLOQ er den laveste konsentrasjonen som kan kvantifiseres og er estimert til å være 4,52 IE/L. Verdiene samsvarer med eksperimentelle LOD-verdier oppnådd, se 5.2.2. Dette er verdier som tilfredsstiller WADAs krav på 5 IE/L [3]. Dette er også den øvre grensen som settes for naturlig forekomst av hCG i menn [41].

5.3.4 Utbytte

Utbytte ble testet som beskrevet i 4.4.4. Det viste seg at utbytte varierte litt mellom de tre konsentrasjonsområder, men var i samme størrelsesorden (se tabell 14). Det er ikke et krav om at utbyttet skal være 100 %, imidlertid må det være reproduserbart, noe som det tyder på at det var her. Prøveopparbeidelsen er kompleks og inneholder mange trinn hvor andeler av

hCG kan gå tapt (som ekstraksjon, trypsinering og SPE), så ut i fra dette synes resultatet rimelig.

Tabell 14: Tabellen viser utbytte for ulike konsentrasjoner hCG tilsatt prøvene.

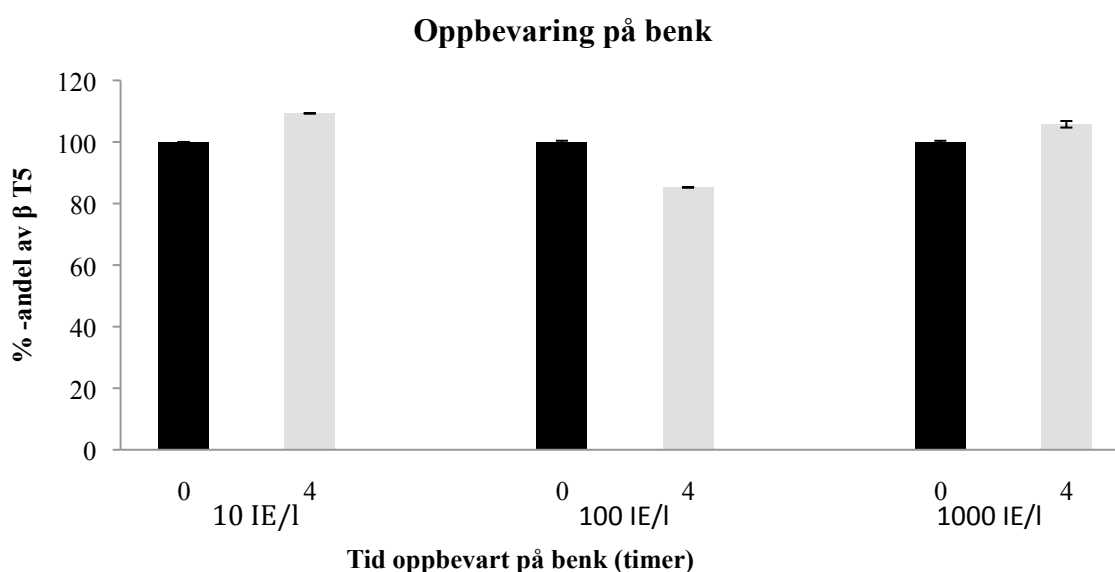
Pregnyl [®] -konsentrasjon (IE/L)	Utbytte %	n
10	65	2
100	57	2
1000	57	3

5.3.5 Stabilitet

Stabiliteten til hCG i urin ble testet som beskrevet i 4.4.5. Det var interessant å undersøke stabiliteten under tre relevante forhold.

Stabilitet på benk:

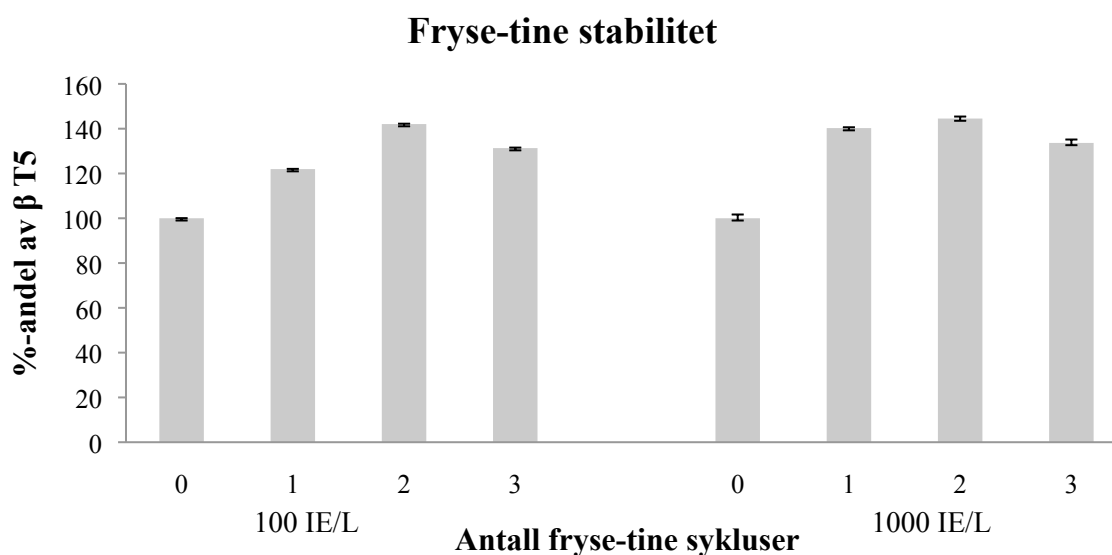
Det ble satt som et krav at prøvene må tåle oppbevaring på benk i 4 timer. Dette er fordi det kan forekomme at prøver oppbevares på benken i et slikt tidsrom. Stabiliteten viste seg å være god, det var ingen markant endring som viste seg etter 4 timers oppbevaring på benk. Resultatet er presentert i et diagram (se figur 5-11). Signalintensitet for prøver som hadde stått 4 timer på benk (i romtemperatur) ble sammenliknet med 0-prøver som ble prøveoppbeholdt direkte.



Figur 5-11: Diagram som viser forskjell i signalintensiteten av βT5 etter 4 timer på benk sammenliknet med 0 timer. 4-timers prøvene ble relatert til 0-timers prøvene (som regnes som 100 % prøver). n=3

Fryse-tine stabilitet:

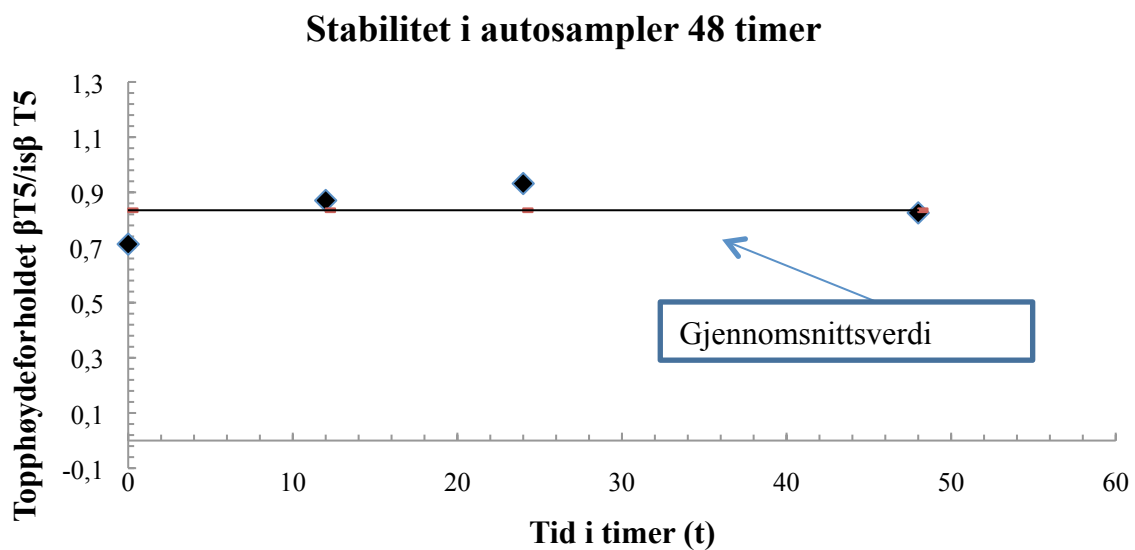
Det viste seg at det var opp til 40 % økning i signalintensiteten for prøver som hadde vært fryst og tint sammenlignet med prøver som ble direkte analysert (se figur 5-12). Det synes noe merkelig at prøvene skulle få bedre intensitet etter fryse- og tine-sykluser. En faktor som kan være av betydning her er at prøve 0 og prøve 1-3 ble analysert på henholdsvis to ulike dager. Det kunne tenkes at dag til dag variasjon påvirker resultatet. Variasjonen mellom kun prøve 1-3 var ikke like stor som 1-3 sammenlignet med 0 prøven og tendensen var lik for både 100 IE/L og 1000 IE/L. Det er benyttet intern standard, men det kan allikevel være forskjell i analyse interdag og dette ble også sett ved validering av presisjon interdag. Det viktigste er imidlertid at intensiteten ikke taper seg etter fryse- og tine-sykluser og det kan derfor konkluderes med at hCG tåler denne behandlingen.



Figur 5-12: Diagrammet viser søylene for prøver som er fryst og tint henholdsvis 0, 1, 2 og 3 ganger. Det er forskjell mellom 0 prøvene og 1-3 prøvene, men variasjonen mellom 1-3 prøvene er relativ liten for begge konsentrasjonene.

Stabilitet ved oppbevaring i autosampler:

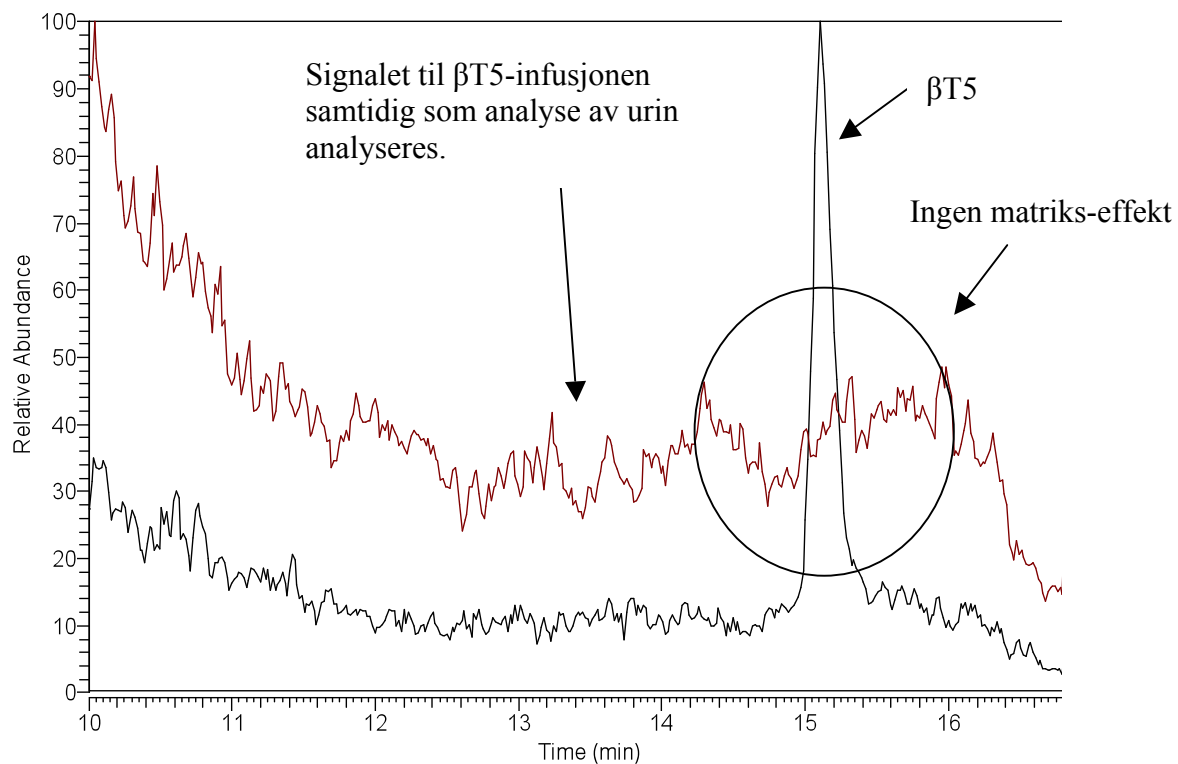
Stabilitet ved oppbevaring i autosampler ble testet som beskrevet i 4.4.5. Resultatet viste liten variasjon mellom prøvene som ble analysert på de ulike tidspunktene noe som tyder på god stabilitet (se figur 5-13). Kravet som ble satt var at prøvene skulle tåle oppbevaring i autosampler i ~ 24-48 timer. Dette gjorde de også og det kan derfor sies at stabilitet i autosampler var god. Lange analyseserier hvor prøvene oppbevares i autosampler over tid kan dermed trygt kjøres.



Figur 5-13: Viser resultatet og hvordan topphøydeforholdet varierte med tid i autosamplern og hvor hvert punkt ligger i forhold til gjennomsnittsverdien av alle fire punktene.

5.3.6 Matrikseffekter

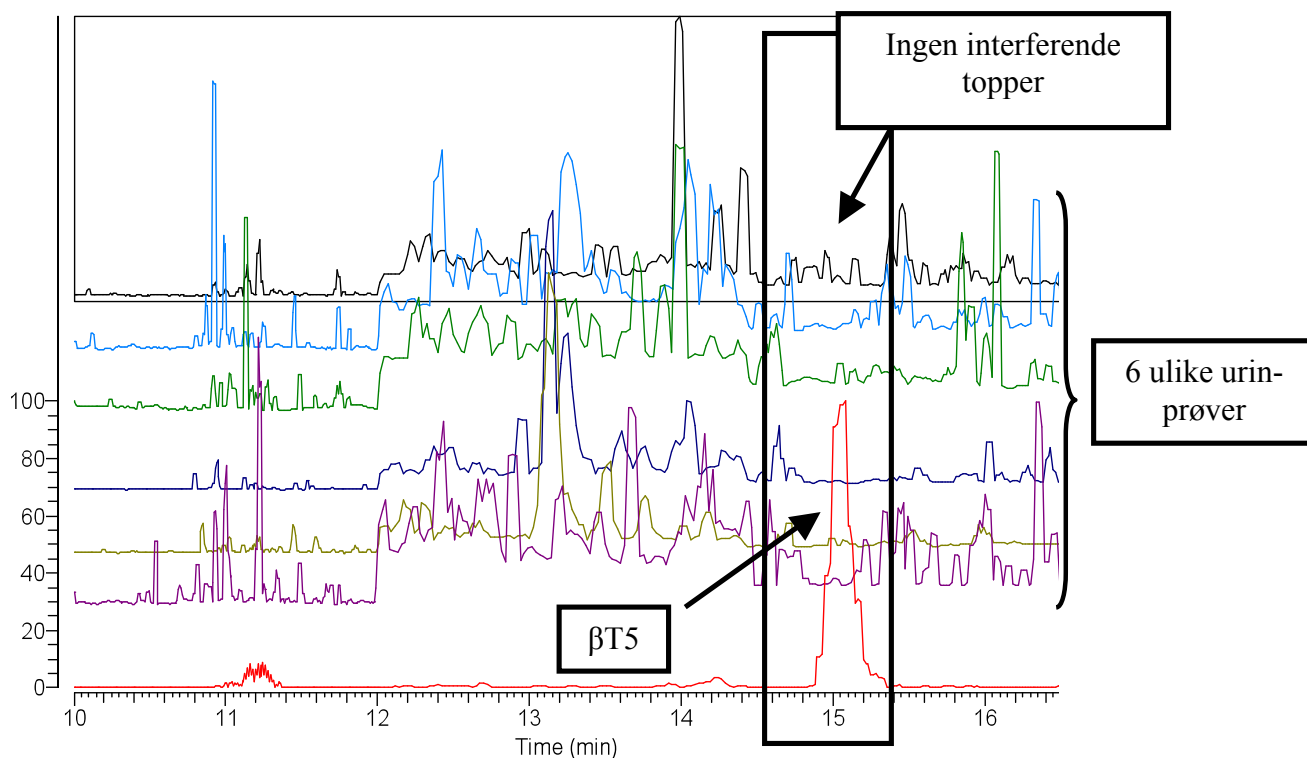
Det ble testet for om urin utøvde matrikseffekter som kunne påvirke deteksjonen av hCG ved MS. Signalet med høyest intensitet nederst i kromatogrammet viser hvor β T5-signalene foreligger (se figur 5-14). β T5-infusjonen er et jevn signal og viser ikke tegn til økt eller senket signal i området rundt β T5-toppen. Kravet til metoden er ingen matriks-effekt i området hvor β T5-toppen foreligger i kromatogrammet. Her er det ingen påvirkning i området hvor toppen kommer og det kan derfor konkluderes med at urin ikke inneholder komponenter som forstyrrer signalet til β T5, noe som igjen vil kunne ha påvirket analyseresultatet.



Figur 5-14: Figuren viser kromatogrammet fra en av 6 urinprøver som ble testet (for å se flere, se appendiks 1). Urin utøvde ingen matrikseffekter som man kan se i innringet område.

5.3.7 Selektivitet

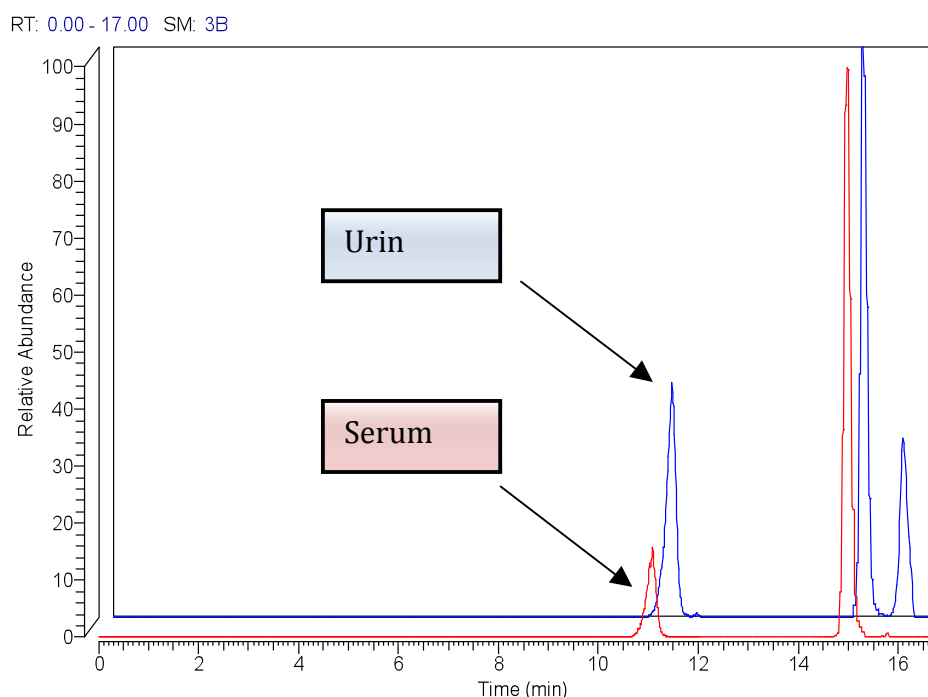
Selektiviteten ble testet ut ved å analysere 6 urinprøver fra frivillige menn. Det var ingen interferende topper i området til toppen for β T5 og kravet for selektivitet er oppfylt (se figur 5-15).



Figur 5-15: Figuren viser 6 kromatogrammer hvor det ikke forekommer noen interferende topper i området hvor β T5-foreligger. Det er tatt med et kromatogram av β T5 hvor hCG-konsentrasjonen er på 10 IE/L for å illustrere hvor i kromatogrammet toppen til β T5 foreligger.

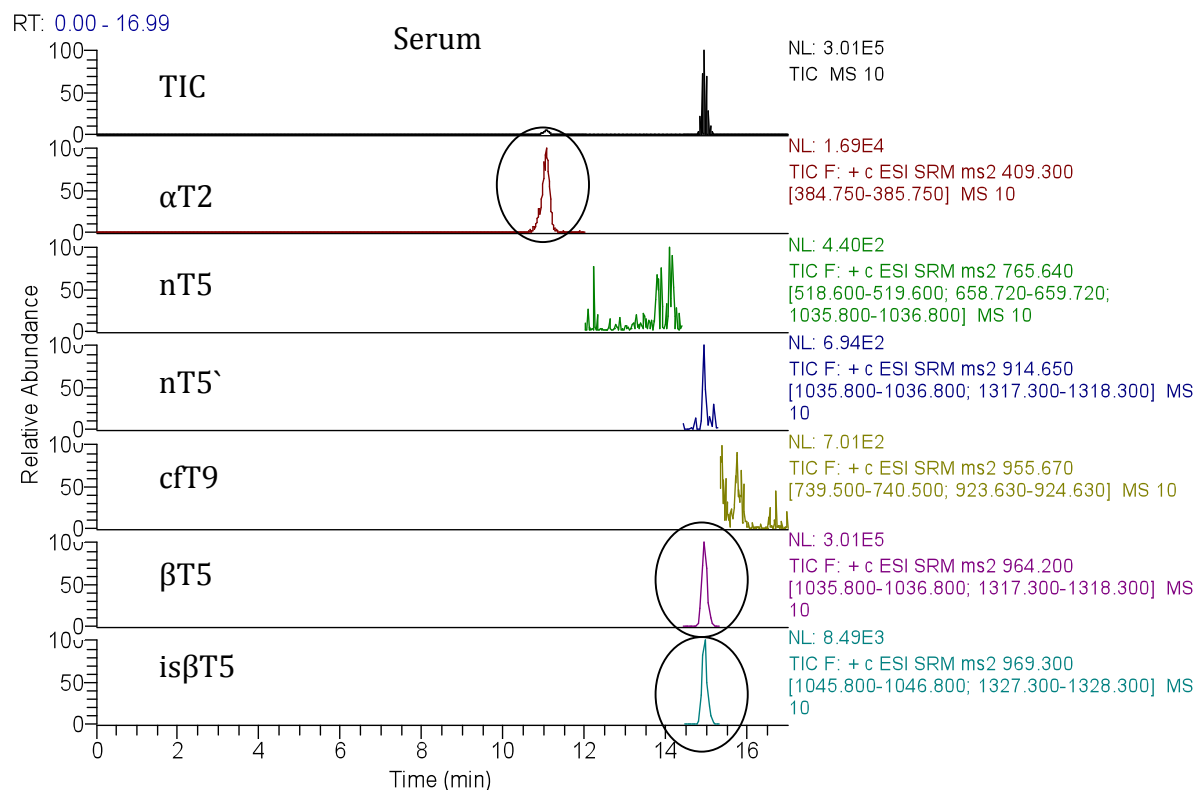
5.4 Analyse av gravidserum og -urin

Det ble analysert urin og serum avgitt fra en gravid kvinne i uke 21 av svangerskapet, dette for å teste metoden på ekte prøver som ikke var spiket med Pregnyl®. Kromatogrammet for urinprøven ga tre hovedtopper og høyere signaler sammenlignet med serum (se figur 5-16). En årsak til dette kan være at hCG oppkonsentreres i morgenurin, dette finner ikke sted i serum. Dette kan derfor tenkes å medvirke til økte konsentrasjoner i urin.

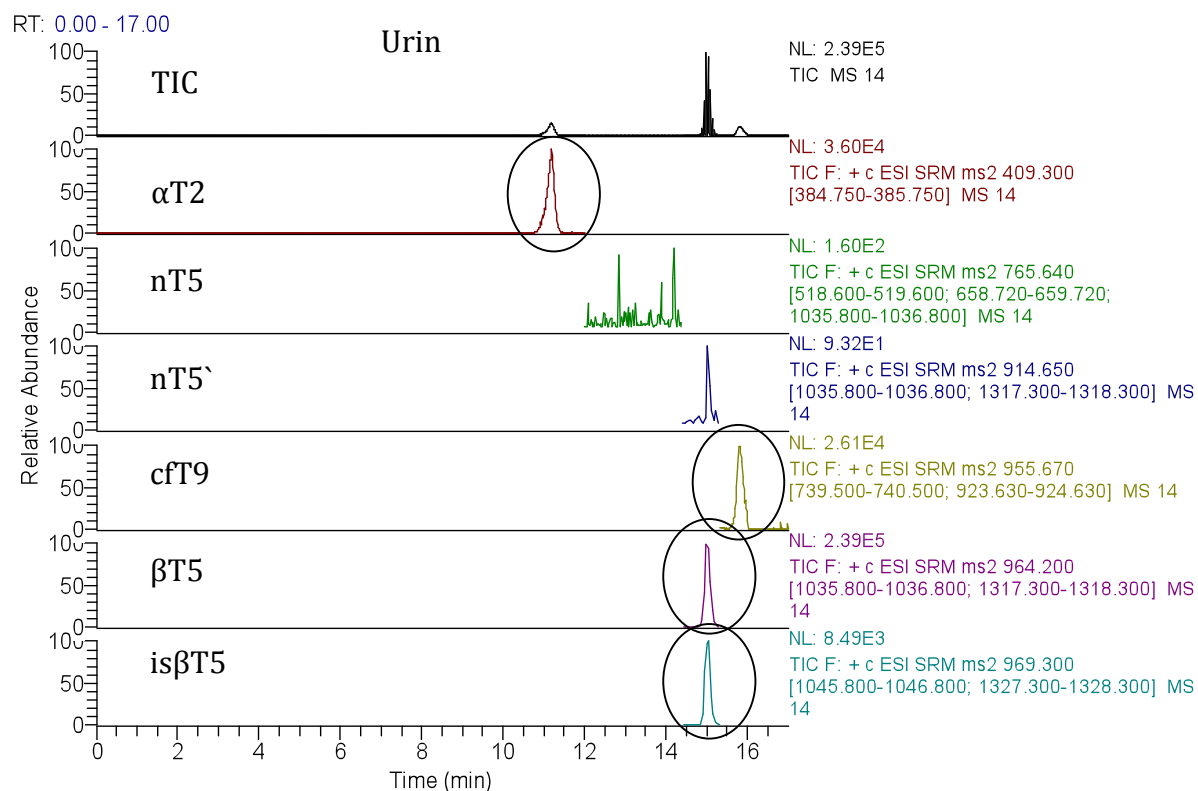


Figur 5-16: Kromatogram av serum og urin fra gravid kvinne.

Metoden som ble benyttet kan detektere flere hCG-isoformer, og disse er vist i kromatogrammer nedenfor (se figur 5-17 og 5-18). Som nevnt i 2.2.2 er det forskjell på hvilke isoformer som forekommer i serum og urin under graviditet. Sammenlignes kromatogrammene fra serum og urin ser man at hCG β cf forekommer kun i urin. Dette er siste degraderingsprodukt fra hCG og forekommer i store mengder i urin hos gravide kvinner fra uke 5 i svangerskapet og utover [15]. Differensiering mellom ulike isoformer er mulig ved bruk av MS, mens bruk av immunoassays ville generert et totalt hCG nivå uten å få noen indikasjon på hvilke isoformer som var tilstede. Kromatogrammene er derfor et bevis på at metoden fungerer på ekte prøver og klarer å detektere isoformene som er tilstede. Dette gjør at metoden kan være egnet til flere bruksområder enn dopinganalyser!



Figur 5-17: Viser hCG-isoformer som forekommer i serum fra gravid kvinne. Det er satt ring rundt de isoformene som ble detektert.



Figur 5-18: Viser hCG-isoformer som forekommer i urin fra gravid kvinne. Det er satt ring rundt detekterte isoformer.

6. Konklusjon

I denne oppgaven har en metode for deteksjon av hCG fra urin blitt optimalisert og validert. Urin ble valgt som matriks på grunnlag av de genererte kromatogrammene som viste klart mindre støy enn de tilsvarende kromatogrammene for serum. Dette antas å skyldes del vesentlig lavere innholdet av proteiner i urin som matriks, og bidrar til at lavere LOD-verdier oppnås for urin enn for serum. I tillegg viste magnetiske kuler seg å være best egnet til immunoekstraksjon av hCG sammenlignet med brønner; dette fordi det tillot høyere prøvevolum som igjen bidro til å generere en eksperimentell LOD-verdi på 2 IE/L, som er vesentlig lavere enn den som ble oppnådd med immunoekstraksjon utført med brønner (10 IE/L). Intern standard ble inkorporert i metoden og gjorde analyseresultatene mer robuste samt muliggjorde kvantifisering. Dette øker i stor grad metodens applikasjonsområde ved at metoden ikke bare er komplementær til de eksisterende immunoassays, men faktisk overgår disse ved å kunne differensiere den totale hCG-responsen i tillegg til å kvantifisere den. Det kan ut fra denne metoden sies noe om hvilke isoformer som befinner seg bak det kvantifiserte resultatet. Spesifisiteten som tilføres ved bruk av SRM som deteksjonsmetode utelukker faren for falsk positive resultater, samt er rettslig holdbar når det gjelder å stadfeste bevis om dopingmisbruk som skal holde rettslig, hvis en idrettsutøver tester positivt på hCG. Det kan konkluderes med at metoden er godt egnet for bruk i dopingsammenheng. Siste steg før implementering i praksis vil være å teste den etablerte metoden ut på en klinisk studie som nevnt i innledningen og som hele tiden har vært det overordnede målet med oppgaven!

Kildeliste

1. Cole, L.A., *Hyperglycosylated hCG, a review*. Placenta, 2010. **31**(8): p. 653-64.
2. Cole, L.A., *New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 8.
3. Stenman, U.H., K. Hotakainen, and H. Alfthan, *Gonadotropins in doping: pharmacological basis and detection of illicit use*. British Journal of Pharmacology, 2008. **154**(3): p. 569-583.
4. Hemmersbach, P., *History of mass spectrometry at the Olympic Games*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(7): p. 839-853.
5. WADA. *Minimum required performance levels for detection of prohibited substances*. Besøkt 20.03.2011; Available from: <http://wada-ama.org/en/Science-Medicine/Archives/>.
6. Lund, H., et al., *Exploring the complementary selectivity of immunocapture and MS detection for the differentiation between hCG isoforms in clinically relevant samples*. J Proteome Res, 2009. **8**(11): p. 5241-52.
7. David L. Nelson, M.M.C., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3 ed. 2000, New York: Worth Publishers.
8. Wikipedia, *Bottom-up proteomics*. 2010.
9. Fryhle, T.W.G.S.o.C.B., *Solomons & fryhles organic chemistry*. 8 ed. 2004, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
10. Conrotto, P. and S. Souchelnytskyi, *Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications*. Exp Oncol, 2008. **30**(3): p. 171-80.
11. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics: Tools for the new biology*. 2002, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
12. Hu, Z., L. Hood, and Q. Tian, *Quantitative proteomic approaches for biomarker discovery*. Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(9): p. 1036-41.

13. Yates, J.R., *Mass spectrometry: from genomics to proteomics*. Trends in Genetics, 2000. **16**(1): p. 5-8.
14. Kicman, A.T., M.C. Parkin, and R.K. Iles, *An introduction to mass spectrometry based proteomics--Detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2007. **260-262**: p. 212-227.
15. Stenman, U.H., et al., *The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(6): p. 769-84.
16. de Medeiros, S.F. and R.J. Norman, *Human choriogonadotrophin protein core and sugar branches heterogeneity: basic and clinical insights*. Human Reproduction Update, 2009. **15**(1): p. 69-95.
17. Cole, L., *Biological functions of hCG and hCG-related molecules*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2010. **8**(1): p. 102.
18. Birken, S., et al., *Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human chorionic gonadotropin and metabolites*. Clin Chem, 2003. **49**(1): p. 144-54.
19. Cole, L.A., *Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites*. Clin Chem, 1997. **43**(12): p. 2233-2243.
20. Stenman, U.-H., H. Alfthan, and K. Hotakainen, *Human chorionic gonadotropin in cancer*. Clinical Biochemistry, 2004. **37**(7): p. 549-561.
21. Tanbo, N.B.O.T., *Induksjon av spermatogenese ved hypogonadotrop hypogonadisme*. Tidsskrift for den norske legeforening, 2008. **3**: p. 327-329.
22. Legemiddelverket. Besøkt 10.04.2011; Available from: http://legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=c4e20e59-6f53-48fc-a1e4-262b0711a390.
23. Torsetnes, S.B., *Bestemmelse av hCG-isoformer i urin, bruk av immunoaffinitet og LC-MS som analyseverktøy*, in *Farmasøytisk Institutt*. 2009, Universitet i Oslo: Oslo.

-
24. Egeland, S.V., *Differensiering mellom intakt hCG og fritt hCG β i serum via bestemmelse av hCG α* , in *Farmasøytisk institutt*,. 2010, Universitet i Oslo: Oslo.
 25. Gam, L.H., S.Y. Tham, and A. Latiff, *Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003. **792**(2): p. 187-96.
 26. Stig Pedersen-Bjergaard, K.E.R., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget
 27. Cappelen. *Serum*. Besøkt 24.04.2011; Available from: <http://www.caplex.no/Web/ArticleView.aspx?id=9331715>.
 28. Leksikon, N. *Urin*. Besøkt 24.04.2011; Available from: http://www.snl.no/sml_artikkel/urin.
 29. Chen, G. and B.N. Pramanik, *Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects*. *Drug Discovery Today*, 2009. **14**(9-10): p. 465-471.
 30. Biosciences. Besøkt 24.04.2011; Available from: <http://www.gbiosciences.com/FOCUSProteinReductionAlkylation-desc.aspx>.
 31. Berger, P., et al., *The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives*. *Tumour Biol*, 2002. **23**(1): p. 1-38.
 32. MitoSciences. Besøkt 24.04.2011; Available from: http://www.mitosciences.com/microplate_protein_quantity_assays.html.
 33. chemagen. Besøkt 24.04.2011; Available from: <http://www.protein-purification.com/174.html>.
 34. Ermer, J. and M. Vogel, *Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis*. *Biomed Chromatogr*, 2000. **14**(6): p. 373-83.

-
35. Nobelprize.org. *The Nobel Prize in Chemistry 2002*. Besøkt 01.04.2011 01.04.2011; Available from: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/index.html.
36. Waters. *How Do We Make Ions?* 2011; Available from: http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10073251&locale=en_US.
37. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
38. Gstaiger, M. and R. Aebersold, *Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(9): p. 617-627.
39. Administration, F.a.D. *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. 2001; Available from: www.fda.gov/.../Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf.
40. EMEA. *Guideline on validation of bioanalytical methods*. 2009; Available from: www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?....
41. Laidler, P., et al., *New decision limits and quality-control material for detecting human chorionic gonadotropin misuse in sports*. Clin Chem, 1994. **40**(7): p. 1306-1311.

Appendiks 1

Kromatogrammer som viser matrikseffekter fra 6 ulike urinprøver avgitt fra 6 mannlige personer:

RT: 10.00 - 16.50 SM: 3B

